

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARÍLIA KAPHAN FREITAS DE CAMPOS

**RELAÇÕES HÍDRICAS, TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE DE
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE
CITRUMELO 'SWINGLE' COM ALTO ACÚMULO DE PROLINA
SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO**

**CURITIBA
2009**

MARÍLIA KAPHAN FREITAS DE CAMPOS

**RELAÇÕES HÍDRICAS, TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE DE
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE
CITRUMELO 'SWINGLE' COM ALTO ACÚMULO DE PROLINA
SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho

Coorientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

**CURITIBA
2009**

À minha querida família, e futura.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho:

Ao Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Santista), pela possibilidade de realizar o trabalho no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR, pela orientação que infelizmente se encerra após cinco anos de valiosos ensinamentos científicos e morais (e por que não, religiosos?), pelo exemplo, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. João Carlos Bespalhok Filho, pela disponibilidade de orientação no programa de pós-graduação, pela confiança e amizade.

Ao Dr. Celso Jamil Marur, pela condução das análises fisiológicas durante o experimento, principalmente pelo comprometimento com o trabalho e sugestões.

Ao Dr. Fábio Suano de Souza, pela participação na banca, também pelo auxílio nas análises fisiológicas, manipulação dos dados e importantes considerações feitas para a redação.

À grande amiga Kenia de Carvalho, pela intensa convivência nestes dois anos, pelos sábados na casa-de-vegetação, cervejinhas, conversas e madrugadas produtivas (ou nem tanto).

Ao Sr. João Batista da Silva, pelo grande cuidado com as plantas antes e após a condução do experimento, e pelo divertido trabalho em equipe na casa-de-vegetação.

À Suely Ario e à Gislaine Vasquez, pela “chatice” que contribuiu muito para o bom funcionamento do laboratório.

À MSc. Ines Fumiko Ubukata Yada, pela realização das análises estatísticas.

Ao Dr. Luiz Filipe P. Pereira, pela ajuda na tomada de decisões, paciência nos momentos de ‘estresse severo’ e pelas considerações.

Ao Dr. Eduardo Fermino Carlos, pela participação na banca e importantes considerações feitas.

Ao Dr. Josemir Moura Maia e ao Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, pelas metodologias de quantificação de atividade enzimática concedidas.

À Universidade Federal do Paraná, pela possibilidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa.

Aos que contribuíram indiretamente, porém não menos importantes:

Aos meus pais, Jennifer e Marcos, meu pleno agradecimento pelo apoio, incentivo, exemplo... Enfim, por tudo o que eu construí até hoje.

Aos meus irmãos Bárbara, Cláudia, Marquinhos, Veridiana e Elias, e aos meus sobrinhos, Pedro, Bibi, Bibi e João Marcos, sempre presentes, mesmo que distantes.

Aos meus avós, Cláudio e Ruth, meus exemplos de amor, luta e determinação.

Ao Léo, o maior entusiasta para que eu prossiga na carreira científica.

À tia Marilinha e ao Tozoni, pelos descansos em Botucatu.

Ao Jáder, meu querido companheiro, pelo amor, compreensão, apoio e principalmente pela paciência na fase final do trabalho.

À Carlise e à Adri, que me acolheram em Curitiba na curta moradia, agradeço pela eterna amizade.

Aos bons amigos: Sandra, pelo imenso coração; Gislaine, pela amizade e exemplo de força; Tiago, pelo enorme carinho; Diogo, pelo companheirismo, pelas viagens à Curitiba e pela, cada vez mais, crescente amizade; Luciana, pelas conversas, thank you!

A todos os amigos e funcionários do LBI e do Laboratório de Cultura de Tecidos do IAPAR, ou aos que passaram, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	4
RESUMO GERAL.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 PANORAMA MUNDIAL E NACIONAL DA CITRICULTURA.....	12
2.2 PORTA-ENXERTOS.....	13
2.2.1 Citrumelo ‘Swingle’.....	15
2.3 DÉFICIT HÍDRICO.....	16
2.3.1 Déficit hídrico e suas consequências para a citricultura.....	16
2.3.2 Fisiologia do déficit hídrico.....	17
2.3.3 Regulação da resposta ao déficit hídrico.....	22
2.3.4 Prolina.....	23
2.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E O ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
2.4.1 Sistemas antioxidantes.....	31
2.4.1.1 Enzimas antioxidantes.....	31
2.4.1.2 Antioxidantes não-enzimáticos.....	32
2.4.2 Prolina e a proteção contra o estresse oxidativo.....	33
3 REFERÊNCIAS.....	36
4 ARTIGO	
Relações hídricas e trocas gasosas em plantas transgênicas de citrumelo	
‘Swingle’ com alto acúmulo de prolina submetidas ao déficit hídrico.....	53
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
4.1 INTRODUÇÃO.....	56
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.2.1 Material vegetal e ensaio de tolerância ao déficit hídrico.....	59
4.2.2 Fotossíntese líquida, transpiração, condutância estomática e eficiência do uso de água.....	60

4.2.3 Fluxo de seiva.....	61
4.2.4 Quantificação do teor de prolina.....	61
4.2.5 Análise estatística.....	62
4.3 RESULTADOS.....	63
4.3.1 Teor de prolina.....	63
4.3.2 Relações hídricas na folha.....	64
4.3.3 Fotossíntese líquida, transpiração, condutância estomática e eficiência do uso de água.....	66
4.3.4 Fluxo de seiva.....	69
4.4 DISCUSSÃO.....	71
4.5 CONCLUSÕES.....	74
4.6 REFERÊNCIAS.....	75
5 ARTIGO	
Alterações na atividade de enzimas antioxidantes em plantas de citrumelo ‘Swingle’ transgênicas com alto acúmulo de prolina em resposta ao déficit hídrico.....	
RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	82
5.1 INTRODUÇÃO.....	83
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	84
5.2.1 Coleta e acondicionamento do material vegetal.....	88
5.2.2 Quantificação do teor de prolina.....	88
5.2.3 Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA)	89
5.2.4 Determinação de antioxidantes totais.....	90
5.2.5 Atividade de enzimas antioxidantes.....	91
5.2.5.1 Extração de proteínas.....	91
5.2.5.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	91
5.2.5.3 Atividade da catalase (CAT).....	92
5.2.5.4 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)	92
5.2.6 Análise estatística.....	93
5.3 RESULTADOS.....	94
5.3.1 Teor de prolina.....	94
5.3.2 Conteúdo de malondialdeído (MDA)	95

5.3.3 Conteúdo de antioxidantes totais.....	96
5.3.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	97
5.3.5 Atividade da catalase (CAT).....	98
5.3.6 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)	99
5.4 DISCUSSÃO.....	100
5.5 CONCLUSÕES.....	106
5.6 REFERÊNCIAS.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ABTS ⁺	Radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ABA	Ácido abscísico
APX	Ascorbato peroxidase
AS	Antisenso (direção)
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
CaMV	Vírus do mosaico da couve-flor
CAT	Catalase
CRA	Conteúdo relativo de água
Cu/ZnSOD	Cobre-zinco superóxido dismutase
CVC	Clorose variegada dos citros
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EM	Estresse moderado
ES	Estresse severo
EUA	Eficiência do uso da água
FeSOD	Ferro superóxido dismutase
GR	Glutathione redutase
GSA	Ácido glutâmico - γ - semialdeído
GSH	Glutathione reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Ka	Constante dielétrica
LEA	"Late Abundant Proteins"
MDA	Malondialdeído
MDHA	Monodeidroascorbato
MDHAR	Monodeidroascorbato redutase
MF	Massa fresca
MnSOD	Manganês superóxido dismutase

MPa	Megapascal
mRNA	RNA mensageiro
MSC	Morte súbita dos citros
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NBT	Nitroblue tetrazolium
NO [•]	Óxido nítrico
¹ O ₂	Oxigênio singleto
O ₂ ^{•-}	Íon superóxido
OH ⁻	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
P2C	Δ ¹ - pirrolina - 2 - carboxilato
P5C	Δ ¹ - pirrolina - 5 - carboxilato
P5CR	Δ ¹ - pirrolina - 5 - carboxilato redutase
P5CS	Δ ¹ - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase
P5CDH	Δ ¹ - pirrolina - 2 - carboxilato desidrogenase
P5CSF129A	P5CS mutante de <i>Vigna aconitifolia</i> (ZHANG <i>et al.</i> , 1995)
PDH	Prolina desidrogenase
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
PVP	Polivinilpirrolidona
REC	Recuperação
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Senso (direção)
SCCL	Suco concentrado e congelado de laranja
SE	Sem estresse
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TDR	Reflectometria no domínio do tempo
UA	Unidades de atividade

UV	Ultra-violeta
Ψ_s	Potencial osmótico
Ψ_t	Potencial total da água
Ψ_g	Potencial gravitacional
Ψ_p	Potencial de pressão
Ψ_r	Potencial matricial

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01 - A) Esquema da via metabólica da biossíntese de prolina a partir de glutamato em plantas; B) Compartimentos celulares envolvidos no processo. (Adaptado de VERBRUGGEN; HERMANS, 2008)..... 25
- FIGURA 02 - Esquema indicando alguns dos agentes estressantes indutores do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as consequências biológicas que desencadeiam uma série de disfunções fisiológicas que podem acarretar em morte celular (Adaptado de SCANDALIOS, 2005)..... 30
- FIGURA 03 - Teor de prolina livre em folhas de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e de plantas controle não transformadas em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa) Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 63
- FIGURA 04 - A) Potencial hídrico total; B) Potencial osmótico; e C) Potencial de pressão em plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e plantas controle não transformadas, durante o período de restrição hídrica. Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$)..... 65
- FIGURA 05 - A) Fotossíntese líquida; B) Transpiração; e C) Eficiência do uso de água (EUA) em plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e plantas controle não transformadas, durante o período de déficit hídrico. Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$)..... 68
- FIGURA 06 - Condutância estomática em plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e plantas controle não transformadas, durante o período de restrição hídrica. Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$)..... 69
- FIGURA 07 - Fluxo de seiva xilemática em plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e em plantas controle não transformadas, durante o período de restrição hídrica. Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). RFA: Radiação fotossinteticamente ativa..... 70

- FIGURA 08 - Teor de prolina livre em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 94
- FIGURA 09 - Conteúdo de MDA em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 95
- FIGURA 10 - Conteúdo de antioxidantes totais em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 96
- FIGURA 11 - Atividade enzimática de SOD em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 97

FIGURA 12 - Atividade enzimática da CAT em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 98

FIGURA 13 - Atividade enzimática de APX em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=3$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 99

RESUMO GERAL

Neste trabalho foi avaliada a tolerância ao déficit hídrico em plantas do porta-enxerto para citros citrumelo 'Swingle' transformadas geneticamente para acumular altos níveis de prolina. As plantas contêm o gene mutante de *Vigna aconitifolia* P5CSF129A, que codifica para a enzima-chave da biossíntese de prolina. Além da avaliação da resposta de parâmetros hídricos e de trocas gasosas sob déficit hídrico em plantas com alto acúmulo de prolina, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito que o maior teor de prolina presente nestas plantas exerce na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Plantas controle não transformadas e plantas transgênicas foram submetidas a um período de 14 e 16 dias sem irrigação, respectivamente. Como parâmetros fisiológicos foram avaliados os potenciais hídrico, osmótico e total das folhas, taxas fotossintéticas e de transpiração, condutância estomática e fluxo de seiva do xilema. Os pontos de coleta para análises bioquímicas foram determinados a partir de medidas de potencial hídrico total, que representaram os seguintes níveis de estresse: Sem estresse (SE; $\Psi_t = -1,3$ MPa), estresse moderado (EM; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), estresse severo (ES; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa) e recuperação (REC; 24 h após reidratação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Folhas foram submetidas às quantificações de prolina, malondialdeído (MDA), antioxidantes totais e determinação da atividade das enzimas CAT, SOD e APX. Plantas transgênicas apresentaram valores 2,5 vezes maiores de prolina nas folhas do que plantas controle nas condições sem estresse e estresse moderado, sendo que plantas controle atingiram níveis similares somente no estresse severo. Houve ajustamento osmótico em plantas transgênicas até o 12º dia de restrição de água, enquanto que plantas controle apresentaram potencial de pressão nulo logo no nono dia. Maiores taxas de fotossíntese, condutância estomática e transpiração também foram observadas em plantas transgênicas do que nas plantas controle durante o período de estresse. Os níveis de MDA foram significativamente maiores em plantas controle do que em transgênicas nas condições de estresse moderado e severo. O conteúdo de antioxidantes totais aumentou com o estresse severo, porém não houve diferença entre os tratamentos em ambos os tipos de plantas. O mesmo padrão decrescente de atividade da SOD e APX foi observado durante o déficit hídrico mais acentuadamente em plantas controle, seguida de elevação 24 h após a reidratação. A CAT foi menos ativa em plantas transgênicas do que nas controle em todos os pontos de coleta. A atividade desta enzima aumentou significativamente durante o período de estresse, havendo redução na recuperação. Tanto resultados das análises fisiológicas como das bioquímicas sugerem que a prolina desempenha um importante papel na tolerância ao déficit hídrico. A manutenção do turgor celular e de trocas gasosas, a redução da peroxidação lipídica e a influência na atividade de enzimas antioxidantes em plantas transgênicas, provavelmente ocorreu devido à ação conjunta das diversas funções do aminoácido prolina como osmorregulador, estabilizador de proteínas e removedor de radicais livres.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; osmoproteção; remoção de ROS; P5CS; tolerância à seca.

WATER RELATIONS, GAS EXCHANGE AND ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY IN TRANSGENIC 'SWINGLE' CITRUMELO OVERACCUMULATING PROLINE UNDER DROUGHT STRESS

ABSTRACT

Water deficit tolerance in transgenic 'Swingle' citrumelo rootstock was evaluated. These plants contain the *Vigna aconitifolia* P5CSF129A transgene coding for the key-enzyme for proline synthesis. Besides the water relations and gas exchange analyses, the aim of this work was to investigate proline effect in superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) antioxidant enzymes. Non-transformed control and transgenic plants were submitted to a 14 and 16-day period without irrigation, respectively. Total, osmotic and pressure potentials, photosynthetic and transpiration rates, stomatal conductance and xylem sap flow were evaluated. For biochemical analysis, leaves were collected based on their total water potential, representing the following stress levels: Irrigated (SE; $\Psi_t = -1.3$ MPa), moderate stress (EM; $\Psi_t = -2.3$ to -2.5 MPa), severe stress (ES; $\Psi_t = -3.8$ to -3.9 MPa) and recovery (REC; 24 h after rehydration; $\Psi_t = -1.3$ to -1.9 MPa). Proline, malondialdehyde (MDA) and total antioxidant contents were quantified and CAT, SOD and APX activities were also evaluated. Leaves of transgenic plants accumulated 2.5-fold higher proline content than non-transformed control plants in moderate and severe stress conditions. Osmotic adjustment was observed in transgenic plants until 12 days after withholding water, while non-transformed control plants presented negative pressure potential after 9 days of water deficit. Higher photosynthetic rates, stomatal conductance and transpiration were also observed in transgenic plants than non-transformed control plants during water stress. MDA content was significantly higher in control during water deficit, in comparison to transgenic plants. Total antioxidant was increased in severe stress condition, but no difference was observed between control and transgenic plants. Both APX and SOD activities decreased during water deficit period, being found in lower amount in control plants, with a following increase 24 h after water stress recovery. CAT was more active in control than in transgenic plants in all stress levels; CAT activity increased significantly during stress period, decreasing after recovery. These physiological and biochemical results suggest that proline plays an important role for drought stress tolerance in plants. The pressure potential and photosynthesis maintenance, the reduction in lipid peroxidation and the proline influence over antioxidant enzymes activity observed in transgenic plants, occurred probably due to the concerted action of proline as an osmoprotectant, protein stabilizer and ROS scavenger.

Key-words: Oxidative stress; osmoprotection; ROS scavenger; P5CS; drought tolerance.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os citros são as frutas mais cultivadas mundialmente, sendo produzidas em mais de 140 países (FAO, 2004). O setor citrícola brasileiro apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país (NEVES; JANK, 2006). O uso de porta-enxertos na citricultura é importante devido às influências diretas exercidas em diversos aspectos fisiológicos e de desenvolvimento da copa, assim como na tolerância a pragas, doenças e estresses ambientais (POMPEU JUNIOR, 2005).

Apesar das regiões citrícolas brasileiras apresentarem boa distribuição de chuvas (DOORENBOS; KASSAM, 1994), períodos de déficit hídrico são frequentes e afetam a cultura em diferentes aspectos (ORTOLANI *et al.*, 1991). A redução de taxas fotossintéticas e de crescimento, a abscisão de folhas, frutos e flores (SENTELHAS, 2005), além do agravamento de danos causados por doenças, são os fatores que afetam a produtividade durante a seca.

Em plantas, a resposta ao estresse ocorre a partir de uma série de eventos envolvidos na ativação de genes e síntese de compostos que induzem modificações bioquímicas e fisiológicas. A diminuição da condutância estomática e aumento no comprimento das raízes melhoram o desempenho das espécies cultivadas durante a imposição à seca. Porém, há menor captação de CO₂ devido ao fechamento dos estômatos e desvio da energia requerida para o crescimento de raízes (VERSLUES *et al.*, 2006). Como forma de tolerância em casos de deficiência hídrica severa, as plantas promovem o influxo de água, através do acúmulo de solutos na célula, que reduz o potencial osmótico, em processo denominado ajustamento osmótico (ZHANG *et al.*, 1999).

Danos causados pelo déficit hídrico induzem o estresse oxidativo, resultado da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006), que afetam o metabolismo de plantas através da oxidação de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos, além de inibir processos fisiológicos como fotossíntese e respiração (SCANDALIOS, 2005). Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), além de compostos não-enzimáticos, compõem sistemas antioxidantes efetivos na proteção contra o estresse oxidativo (PERL-TREVES; PERL, 2002). O

funcionamento desses sistemas, porém, pode ser interrompido em condições de estresse, como o déficit hídrico, induzindo maior produção de ROS. Essa situação requer mecanismos que amenizem o processo autocatalítico sofrido pelas plantas, e o acúmulo de prolina pode desempenhar essa função.

A prolina é acumulada durante estresses ambientais e nessas situações atua como mediador do ajustamento osmótico, estabilizador de proteínas (VAN RENSBURG *et al.*, 1993) e removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SMIRNOFF; CUMBES, 1989), entre diversas outras funções. A biossíntese de prolina em plantas se dá principalmente via glutamato, através de duas reações que envolvem as enzimas Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase (P5CS) e Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato redutase (P5CR) (DELAUNEY; VERMA, 1993). A P5CS é limitante neste processo, sendo inibida pelo acúmulo do aminoácido (ZHANG *et al.*, 1995). Estes mesmos autores observaram que a enzima mutante P5CSF129A de *Vigna aconitifolia* não sofre inibição, promovendo maior acúmulo de prolina nos tecidos.

Esta e outras enzimas envolvidas no metabolismo de prolina vêm sendo utilizadas em estudos relacionados à tolerância a estresses abióticos como a seca e o estresse salino em diversas espécies vegetais (MOLINARI *et al.*, 2004; DE RONDE *et al.*, 2004; HMIDA-SAYARI *et al.*, 2005). Além disso, nos últimos anos tem-se dado mais enfoque ao papel que o aminoácido exerce na proteção contra o estresse oxidativo em plantas, através da manipulação de níveis endógenos e exógenos de prolina, resultando em dados importantes referentes ao seu efeito nas atividades das enzimas antioxidantes (KOCSY *et al.*, 2005; HOQUE *et al.*, 2007a; OZDEN *et al.*, 2009). Os conhecimentos do papel da prolina na remoção de ROS e na expressão e atividade de enzimas antioxidantes são baseados essencialmente em estudos que utilizam altas aplicações exógenas desse aminoácido. Poucos trabalhos abordam essas funções da prolina em sistemas vegetais com elevada produção endógena (KOCSY *et al.*, 2005; MOLINARI *et al.*, 2007).

Molinari *et al.* (2007) observaram que o aumento da prolina em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico atuou mais como um agente antioxidante do que como um osmoprotetor, já que não ocorreu ajustamento osmótico nessas plantas em solos secos, havendo, porém, proteção

do aparato fotossintético. Por outro lado, plantas de citrange ‘Carrizo’ transgênicas acumularam cerca de cinco vezes mais prolina do que plantas não transformadas (MOLINARI *et al.*, 2004). Os parâmetros fisiológicos quantificados nesse trabalho mostraram que o melhor aproveitamento da água por plantas transgênicas, devido ao ajustamento osmótico, resultou em maiores taxas fotossintéticas, e por isso apresentaram-se mais tolerantes ao déficit hídrico do que plantas controle não transformadas. Porém, nesse caso não foi avaliado o papel adicional da prolina na proteção contra o estresse oxidativo.

O citrange ‘Carrizo’ é amplamente utilizado como modelo para transformação genética de plantas de citros, já que apresenta grande capacidade de regeneração *in vitro*. A sua utilização como porta-enxerto, entretanto, é bastante limitada devido a algumas características desfavoráveis que afetam seu desempenho em campo, como por exemplo, a suscetibilidade ao declínio dos citros (BERETTA *et al.*, 1994). Dessa forma, a utilização de plantas transgênicas de citrumelo ‘Swingle’ com alto acúmulo de prolina representa uma estratégia promissora para aumentar a tolerância ao déficit hídrico, além de proporcionar material importante tanto para estudos de tolerância ao estresse como para a utilização direta em sistemas produtivos.

Também, plantas cítricas, entre as quais o citrumelo ‘Swingle’, são conhecidas pela sua capacidade de produzir e acumular altos níveis de prolina livre nas folhas mesmo em condições normais de crescimento e desenvolvimento (NOLTE; HANSON, 1997), o que as torna uma planta modelo para estudos sobre os efeitos de alta concentração de prolina endógena na fisiologia de plantas

Esse trabalho teve como objetivos: avaliar tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas de citrumelo ‘Swingle’ superexpressando o gene mutante *P5CSF129A*, com alto acúmulo de prolina, através da caracterização das relações hídricas e de trocas gasosas; e avaliar as alterações na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase, envolvidas na proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS) tanto em condições normais de suprimento de água, como em resposta ao déficit hídrico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PANORAMA MUNDIAL E NACIONAL DA CITRICULTURA

As frutas cítricas são cultivadas em mais de 140 países, porém apenas algumas áreas concentram a maior parte da produção (FAO, 2004). O Brasil destaca-se nesse cenário por produzir anualmente cerca de 20 milhões de toneladas de citros, sendo 90% destes representados por laranjas (FAO, 2007). Estima-se que 18,5 milhões de toneladas da fruta serão colhidas no Brasil na safra 2008/2009, em uma área de 820 mil hectares (IBGE, 2008).

A produção chinesa igualou-se à do Brasil na safra 2007/2008 (USDA, 2008), entretanto, apenas 14% desse montante refere-se à produção de laranja, visto que a China é reconhecida como o maior produtor mundial de tangerinas (FAO, 2007). Os Estados Unidos ocupam o terceiro lugar, tendo colhido 11,5 milhões de toneladas na safra 2007/2008, 73% das quais representadas por laranjas (USDA, 2008), e o México e a Espanha também apresentam números expressivos no contexto mundial, respondendo, respectivamente, por 6,5% e 4,2% da produção total (FAO, 2008).

Apenas 20% da laranja produzida no país é destinada ao consumo *in natura*, sendo o restante comercializado para industrialização da fruta, principalmente a produção de suco concentrado e congelado de laranja (SCCL) (NEVES; JANK, 2006). Na temporada 2007/2008 o Brasil produziu 1,35 milhões de toneladas dessa *commodity*, o que representou a fatia de aproximadamente 60% do total mundial. Cerca de 90% do SCCL produzido no Brasil abastece o mercado externo, sendo a União Européia a principal importadora (60%), seguida pelo NAFTA (20%). O restante é exportado para os países do Mercosul, Ásia e Oceania (ABECITRUS, 2008).

O sistema agroindustrial citrícola brasileiro envolve diferentes segmentos como de insumos, produção, indústria processadora e *packing houses*, distribuição e consumo, elos que estabelecem uma cadeia produtiva que movimenta cerca de R\$ 9 bilhões por ano e gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos (NEVES; JANK, 2006). Esse importante sistema é

principalmente representado pelo estado de São Paulo, que produz anualmente em torno de 14 milhões de toneladas de laranja, 80% da produção nacional, em mais de 600 mil hectares de área plantada (IEA, 2008). Em segundo lugar encontra-se o estado da Bahia, responsável por 5% da produção, seguido pelos estados de Sergipe (4,2%), Minas Gerais (3,2%), Paraná (2,3%) e Rio Grande do Sul (1,2%) (IBGE, 2006).

A citricultura paranaense se estabeleceu ao final da década de 80, quando foi rompida a interdição de áreas para o plantio devido à ocorrência de cancro cítrico. Isso foi possível através de resultados de pesquisa que preconizam uma produção fundamentada em bases sanitárias e tecnológicas. As regiões Norte e Noroeste do Estado concentram a produção de laranja para fins industriais, totalizando 19,4 mil hectares de área plantada, e na região do Vale do Ribeira estabeleceu-se a exploração de tangerinas para o mercado de frutas frescas em uma área de 9,5 mil hectares. As indústrias paranaenses estimam para a safra 2008/2009 uma produção de 440 mil toneladas de laranja, que serão transformadas em 35,8 mil toneladas de suco destinado à exportação. Atualmente existem três empresas responsáveis pela moagem de laranja, duas ligadas ao sistema cooperativista, Cocamar e Corol, e a Citri, uma indústria privada de citricultores (DERAL/SEAB, 2008).

2.2 PORTA-ENXERTOS

A utilização de porta-enxertos na citricultura permite criar uma associação mutuamente benéfica entre dois organismos geneticamente distintos, cada qual com suas características, levando à formação de uma nova planta produtiva e longeva, que irá sofrer influências de sua origem dupla, uma vez que nem sempre são harmônicas as necessidades da copa e do porta-enxerto (POMPEU JUNIOR, 2005).

Dentre as diversas alterações da copa influenciadas pelo porta-enxerto, destacam-se as relacionadas ao desenvolvimento, produção, maturação e peso dos frutos, teores de açúcares, ácidos e outros componentes do suco, absorção, síntese e utilização de nutrientes, transpiração e tolerância a pragas, doenças e

estresses ambientais, como déficit hídrico e salinidade. As influências da copa sobre o porta-enxerto são menos visíveis, mas ocorrem no desenvolvimento radicular e na tolerância ao frio, seca, pragas e doenças (POMPEU JUNIOR, 2005).

O limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) é o principal porta-enxerto utilizado na citricultura brasileira desde o início da década de 60, já que confere alta produtividade e precocidade à copa, é compatível com todas as variedades comerciais de laranja doce, além de ser tolerante ao déficit hídrico (FUNDECITRUS, 2004). Na década de 1970, devido ao declínio dos Citros, uma doença que afeta plantas enxertadas em limão 'Cravo', iniciou-se uma pequena diversificação por porta-enxertos tolerantes, liderada pela tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka), seguida por limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana* V. Ten. & Pasq.), tangerina 'Sunki' (*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka) e citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.).

Apesar disso, predominou a utilização do limão 'Cravo' em novos plantios, sendo que em 1999 esse porta-enxerto estava presente em 80% dos pomares brasileiros (FUNDECITRUS, 2003). Em 2001 foi identificada a Morte Súbita dos Citros (MSC), uma doença de combinação copa/porta-enxerto que afeta seriamente as variedades de laranja doce enxertadas em limão 'Cravo' e, com menor intensidade, em limão 'Volkameriano'. A intolerância destes porta-enxertos à presença do agente causal da MSC ocasiona a morte das plantas, uma vez que o fluxo normal de nutrientes da copa para a raiz é aparentemente bloqueado, levando à consequente diminuição do sistema radicular e da capacidade de absorção de água e sais minerais (FUNDECITRUS, 2007). Estima-se que 4 milhões de plantas foram erradicadas desde o primeiro levantamento da doença, em 2002.

Foi observado, porém, que plantas enxertadas em tangerina 'Cleópatra' e citrumelo 'Swingle' adjacentes às áreas contaminadas não apresentavam os sintomas. Assim, o surgimento da MSC acelerou o processo de diversificação de porta-enxertos, e em 2003 apenas 39,8% das mudas estavam enxertadas em limão 'Cravo'. As demais utilizaram tangerina 'Cleópatra' (32,6%), citrumelo 'Swingle' (13,8%) e tangerina 'Sunki' (7,1%) (FUNDECITRUS, 2003).

Apesar da tolerância a doenças, os principais porta-enxertos alternativos ao limão 'Cravo' apresentam algumas limitações, como o início de produção tardio observado em tangerina 'Cleópatra', a incompatibilidade de laranja 'Pêra' com citrumelo 'Swingle' e principalmente a susceptibilidade à seca em ambos (POMPEU JUNIOR, 2005).

2.2.1 Citrumelo 'Swingle'

O citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) é um híbrido originado do cruzamento entre pomelo 'Duncan' (*Citrus paradisi*) e trifoliata (*Poncirus trifoliata*). A utilização desse porta-enxerto ocorre principalmente devido à sua alta tolerância a diversas doenças, como a tristeza, declínio, exocorte e xiloporose, e a resistência à MSC, gomose de *Phytophthora* e nematóide dos citros (POMPEU JUNIOR, 2005).

Frutos de laranjeiras enxertadas em citrumelo 'Swingle' apresentam boa qualidade, com altos índices de açúcares e rendimento industrial na extração do suco. O vigor das plantas é maior do que o observado em mudas enxertadas em trifoliata, similar ao das enxertadas em citranges e é menor do que o observado em limão 'Cravo' ou tangerina 'Cleópatra'. Entretanto, a tolerância a doenças proporcionada pelo citrumelo 'Swingle' propicia o desenvolvimento das plantas enxertadas em árvores de grande porte (POMPEU JUNIOR, 1991).

As principais limitações para o uso do citrumelo 'Swingle' são a suscetibilidade ao déficit hídrico e a incompatibilidade com algumas variedades comerciais de laranja doce. A intolerância à seca é semelhante ao comportamento do trifoliata e seus híbridos. Apesar disso, plantas enxertadas em citrumelo 'Swingle' parecem responder bem após o período de seca, emitindo fortes floradas com bom pegamento dos frutos (CITROLIMA, 2005).

Variedades comerciais de copas como laranja 'Pêra', tangor 'Murcott' e alguns limões verdadeiros são incompatíveis com o citrumelo 'Swingle'. A enxertia com outras como 'Bahia', 'Valência', 'Natal' e 'Ponkan' tem sido utilizada com sucesso. A incompatibilidade, entretanto, pode ser contornada através do uso de um interenxerto entre a copa desejada e o porta-enxerto. Mudas de laranja Pêra,

por exemplo, enxertadas em brotos de laranja 'Hamlin' ou 'Valência' previamente enxertadas em 'Swingle' são viáveis e podem ser produzidas comercialmente (GIRARDI; MOURÃO FILHO, 2006).

2.3 DÉFICIT HÍDRICO

2.3.1 Déficit hídrico e suas consequências para a citricultura

O déficit hídrico é o fator ambiental que frequentemente mais influencia a produtividade da citricultura brasileira (ORTOLANI *et al.*, 1991). A maioria das regiões citrícolas no país apresenta condições hídricas favoráveis ao desenvolvimento da cultura, que demanda precipitação variando de 900 a 1200 mm anuais (DOORENBOS; KASSAM, 1994), em um regime definido no qual normalmente um período quente e úmido precede outro seco com temperaturas amenas. Suprimentos hídricos menores que 50 a 60 mm por mês, durante dois a quatro meses, associados ou não a baixas temperaturas, são essenciais para que haja redução no metabolismo das plantas, condicionando o período de dormência, fundamental para a concentração da florada. Entretanto, isso somente ocorre se houver subsequente suprimento hídrico adequado (DOORENBOS; KASSAM, 1994). Períodos prolongados de seca prejudicam o desenvolvimento da cultura, como a estiagem observada entre agosto e outubro de 2007, que levou à redução de 30% a 40% na produção de variedades precoces no estado de São Paulo e possivelmente acarretará em redução na safra 2008/2009 (VIANA; BRAGA, 2007).

As implicações da deficiência hídrica em plantas cítricas dependem da fase fenológica em que estas se encontram. As respostas dos pomares ao déficit hídrico iniciam-se com o fechamento dos estômatos e consequente redução na fotossíntese e crescimento das plantas. Ocorre o encurvamento das folhas e queda destas e de frutos jovens, ou redução no crescimento dos frutos já desenvolvidos. Durante o florescimento, a seca leva à queda das flores e consequentemente à redução na produção, o que também está associado à redução da translocação de nutrientes, especialmente o nitrogênio, para as

plantas (SENTELHAS, 2005). Deficiências hídricas significativas ao longo do crescimento e desenvolvimento dos frutos, além dos problemas citados, quando sucedidas por novo período de chuvas, induzem à florada temporã, o que geralmente resulta na redução do rendimento da florada principal (ORTOLANI *et al.*, 1991; DOORENBOS; KASSAM, 1994).

Além de afetar a produtividade e a qualidade dos frutos, déficits hídricos também podem agravar sintomas de doenças, podendo inclusive causar a morte das plantas doentes. Isso é observado principalmente em doenças vasculares, como CVC (Clorose Variegada dos Citros) (MEDINA, 2002; MACHADO *et al.*, 2007) e o declínio dos Citros (BERGUER, 1998).

Ao definir estratégias para reduzir riscos na citricultura, deve-se considerar que estiagens curtas são mais prováveis e possivelmente contornáveis pela combinação adequada de práticas de cultivo. Por outro lado, estiagens mais longas, embora menos frequentes, são mais difíceis de serem contornadas por simples práticas de manejo (CUNHA; BERGAMASCHI, 1992). Apesar da incidência de déficits temporários nas regiões produtoras, o Brasil é um dos países com produção em larga escala caracterizada pela não-irrigação. Embora tenha ocorrido aumento de áreas irrigadas no norte do estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2004), como alternativa à diversificação de porta-enxertos devido à incidência de MSC, o uso de irrigação é ainda pequeno no país, principalmente devido aos custos da implantação.

2.3.2 Fisiologia do déficit hídrico

A seca é um estresse multidimensional que afeta as plantas em diversos níveis de organização, sendo definida basicamente como uma circunstância na qual plantas sofrem redução no seu crescimento e produtividade devido à insuficiência de suprimento de água no solo, ou a um grande déficit de umidade do ar (PASSIOURA, 1997). A baixa disponibilidade hídrica é atualmente o principal fator ambiental que limita o crescimento e a produtividade de plantas em todo o mundo, e as mudanças climáticas globais provavelmente contribuirão para

que a falta de água se torne um fator de restrição ainda maior da produção em diversas áreas (CHAVES *et al.*, 2003; HAMDY *et al.*, 2003).

Os efeitos do déficit hídrico variam em função de diversos fatores, como a intensidade do estresse, velocidade de imposição e estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra (KREMER; BOYER, 1995). A redução da disponibilidade hídrica pode ser determinada pela queda no potencial de água (Ψ_t) (KREMER; BOYER, 1995), parâmetro que na maioria dos casos é o primeiro sinal percebido e evitado pela planta. O conteúdo de água nos tecidos é mantido em condições não-estressantes de forma que as taxas de perda e captação de água estejam em equilíbrio, o qual é sustentado em princípio devido ao movimento estomático. Modificações no desenvolvimento que aumentam a razão raiz/parte aérea, a capacidade de acumular água nos tecidos, o espessamento da cutícula e sua permeabilidade também são fatores de grande importância na manutenção do equilíbrio do teor de água em tecidos vegetais (VERSLUES *et al.*, 2006).

Durante estágios iniciais do estresse, um pequeno dessecamento do solo é suficiente para induzir o aumento da concentração de ácido abscísico (ABA) no xilema (HARTUNG *et al.*, 2002). Também ocorre alteração da condutividade hidráulica da raiz e do xilema (STEUDLE, 2000; JAVOT; MAUREL, 2002) que, ao transportar o ABA acumulado, pode levar ao fechamento dos estômatos nas horas mais quentes do dia (TARDIEU; SIMONNEAU, 1998) e redução no crescimento das folhas, enquanto que o crescimento das raízes é mantido (HSIAO; XU, 2000). A manutenção da expansão radicular e a diminuição na condutância estomática melhoram o desempenho de espécies cultivadas durante a seca, entretanto, nesses casos ocorre queda nas taxas fotossintéticas devido à menor captação de CO₂ pelos estômatos, e o crescimento das raízes requer energia que é desviada de tecidos fotossintéticos e reprodutivos. Além disso, com o prolongamento do estresse esses mecanismos para evitar a perda de água não oferecem mais proteção contra os efeitos do baixo potencial hídrico (VERSLUES *et al.*, 2006).

Com a diminuição da transpiração em casos de déficit hídrico severo, a planta perde a habilidade de manter o equilíbrio entre a captação e perda de água, já que os níveis de água tanto no solo quanto nas células são baixos. Como

mecanismo de tolerância, as plantas devem evitar a dessecação celular, seja impedindo o efluxo ou promovendo o influxo de água. O primeiro caso ocorre devido ao espessamento da parede celular e o segundo é resultado do acúmulo de solutos na célula, que reduz o potencial osmótico (Ψ_s), em processo denominado ajustamento osmótico (ZHANG *et al.*, 1999).

Esses solutos são denominados solutos compatíveis, osmólitos compatíveis ou osmoprotetores e podem ser acumulados em grandes quantidades, não interferindo no metabolismo celular, além de apresentarem outras funções protetoras (YANCEY *et al.*, 1982). Aminoácidos como prolina, compostos quaternários e outras aminas, como glicinabetaína e poliaminas, e uma variedade de açúcares e álcoois de açúcar, como manitol, trealose, galactinol e rafinose, estão entre os principais solutos compatíveis acumulados durante o estresse (MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

A limitação no desenvolvimento das plantas imposta pelo estresse ocorre principalmente devido à quebra no balanço de carbono, que é dependente das taxas de fotossíntese e respiração. Mais da metade do total de CO₂ assimilado é consumido no processo respiratório para manutenção e crescimento, porém, esse equilíbrio é perdido durante a falta de água (FLEXAS *et al.*, 2006). Atualmente existe consenso entre autores de que o fator que leva à queda da fotossíntese nesse caso é a reduzida difusão do CO₂ atmosférico ao sítio de carboxilação (CHAVES; OLIVEIRA, 2004; FLEXAS *et al.*, 2004), seja devido à resistência estomática ou menor condutância no mesófilo (WARREN *et al.*, 2004). Além disso, baixos potenciais hídricos impedem processos fotossintéticos devido a prejuízos no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa (LARCHER, 2000).

Ainda, quando plantas desidratadas são expostas a outros tipos de estresse como altas temperaturas ou luminosidade, pode ocorrer fotoinibição, que é a redução no potencial fotossintético quando a atividade dos fotossistemas é máxima, produzindo poder redutor (NADPH) e energia química (ATP) que não são consumidos pelo ciclo de Calvin, devido à baixa disponibilidade de CO₂ (LUDLOW; POWLES, 1988). Como não ocorre a transferência dos elétrons provenientes da fotólise da água, estes levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que oxidam inicialmente compostos dos fotossistemas (PS), como centros de reação do PS II e proteína D1, e também diversas moléculas

biológicas (MAXWELL; JOHNSON, 2000), como será discutido posteriormente. O principal mecanismo de dissipação de energia nesses casos envolve o ciclo das xantofilas, que atua como uma importante estratégia na tolerância ao estresse (DEMMING-ADAMS; ADAMS, 1996).

Diversos parâmetros fisiológicos envolvidos na resposta ao déficit hídrico são passíveis de quantificação. Esse monitoramento promove uma definição precisa das condições do sistema solo-planta-atmosfera e é pré-requisito para possibilitar a reprodução e interpretação de experimentos. O estado da água nos substratos e em tecidos vegetais pode ser determinado diretamente a partir de medições do conteúdo hídrico, ou por medidas baseadas no estado de energia da água nesses sistemas (JONES, 2007).

Diversas abordagens e ferramentas podem ser utilizadas para medidas do conteúdo de água nos substratos. Uma medida básica, que pode ser usada para calibração de outros métodos, é avaliar diretamente a umidade no solo por medidas gravimétricas, através da diferença entre o peso dos solos em capacidade de campo e após a restrição de água (KIRKHAM, 2004). Outras medidas incluem sensores de capacitância ou eletromagnéticos, como sondas TDR (reflectometria no domínio do tempo), e baseiam-se no fato de que a constante dielétrica da água é bastante distinta dos outros componentes do solo, assim o sinal captado pela sonda pode ser relacionado à umidade (JONES, 2007). No sistema vegetal, pode-se medir diretamente o componente hídrico através do conteúdo relativo de água (CRA) nas folhas (BARRS, 1968), dado pela seguinte expressão: $CRA = (\text{peso fresco/peso seco}) / (\text{peso túrgido/peso seco})$.

O potencial total da água (Ψ_t) é um parâmetro de medida baseada no estado de energia da água. No sistema solo-planta-atmosfera o Ψ_t é resultado da soma de diferentes componentes descritos na seguinte expressão: $\Psi_t = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g [+ \Psi_r]$, onde Ψ_s é o potencial osmótico devido aos solutos diluídos, o Ψ_p é o potencial de pressão, o Ψ_g é o potencial gravitacional que reflete a diferença de elevação entre os níveis de interesse e de referência, relevante apenas ao avaliar árvores de grande porte, e o Ψ_r é o potencial matricial, considerado no potencial hídrico do solo (KRAMER; BOYER, 1995). As medidas de potencial em plantas podem ser realizadas por meio de métodos psicrométricos, que envolvem o equilíbrio do tecido vegetal com o ambiente em uma câmara hermeticamente

fechada e a estimacão da pressão de vapor utilizando termopares (KRAMER; BOYER, 1995). O Ψ_t em folhas de laranja 'Valência' enxertadas em limoeiro 'Cravo' e trifoliata foi de -1,0 a -1,5 MPa, respectivamente, em condições normais de suprimento de gua. Após nove dias sem irrigação, essas plantas apresentaram potenciais de aproximadamente -2,8 MPa (MEDINA *et al.*, 1999).

Além dos métodos para medição direta das relações hídricas, estudos utilizam indicadores indiretos do estado da água baseados em análises do crescimento de plantas ou em respostas fisiológicas conhecidas por serem indicativas de déficits hídricos (JONES, 2004). As análises de crescimento incluem avaliações de mudanças morfométricas em ramos, folhas e frutos, assim como redução da expansão celular e de taxas de crescimento (FERERES; GOLDHAMER, 2003; NAOR; COHEN, 2003). J os parâmetros fisiológicos envolvem respostas como o fechamento estomático e redução de taxas fotossintéticas (JONES, 2007).

Em folhas de citros expostas à luz saturante, sob condições normais de suprimento hídrico, a taxa de assimilação de carbono durante a fotossíntese (A) varia de 4 a 12 $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (MACHADO *et al.*, 1994; SYVERTSEN; LLOYD, 1994; MEDINA; MACHADO, 1998). Esses números normalmente são acoplados à abertura dos estômatos, mensurada pela condutância estomática (g_s), com valores de 0,1 a 0,3 $\mu\text{mol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e raramente ultrapassam taxas máximas de 0,4 $\mu\text{mol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em condições naturais. Durante déficits hídricos severos, plantas de laranja enxertadas em limão 'Cravo' e trifoliata apresentaram taxas de fotossíntese de 1,1 e 2,2 $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, respectivamente, acompanhadas por valores praticamente nulos de condutância estomática (MEDINA; MACHADO, 1998).

As taxas de transpiração aumentam linearmente com o aumento da condutância estomática, e podem ser expressas em $\text{mmol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A perda de água para a atmosfera também pode ser estimada através da quantificação do movimento hídrico nas plantas, pela determinação do fluxo de seiva do xilema. Essas medidas têm sido realizadas com base em metodologias de fornecimento de calor no caule e são utilizadas por vários autores, que adotaram este método tanto em plantas herbáceas (BAKER; VAN BAVEL, 1987; HEILMAN; HAN, 1990; COHEN *et al.*, 1981), como em plantas lenhosas (ANGELOCCI; VALANCOGNE,

1993; MARIN, 2000). Em citros, o fluxo de seiva xilemática pode atingir valores de $150 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, no momento em que há maior demanda evaporativa da atmosfera, e esses valores podem decair a mais da metade em situações estressantes.

A relação entre a taxa de assimilação de CO_2 pela fotossíntese (A) e a taxa de perda de água pela transpiração (E) pode ser expressa numericamente pela razão A/E resultando em um índice denominado “eficiência do uso da água” (EUA) (KRAMER; BOYER, 1995). Em citros, embora as taxas de fotossíntese sejam menores do que outras espécies C_3 , a EUA é considerada alta quando comparada a outras plantas como macieira ou melão, com valores variando de 1 a $4 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mmol H}_2\text{O}^{-1}$, que dependem da hora do dia, em condições normais de suprimento de água (MEDINA *et al.*, 1999). Estes mesmos autores, porém, observaram valores de EUA próximos de zero, ao trabalharem com plantas de laranjeira Valência submetidas ao déficit hídrico.

2.3.3 Regulação da resposta ao déficit hídrico

O estresse em plantas causa mudanças em suas condições de crescimento que alteram ou prejudicam a homeostase no metabolismo. Tais mudanças requerem um ajuste das vias metabólicas, visando adquirir um novo estado de homeostase, em um processo denominado aclimação ou tolerância (MITTLER, 2006; SUZUKI; MITTLER, 2006).

De uma forma geral, o processo de aclimação envolve uma série de mecanismos complexos que se iniciam com a percepção da planta ao estresse, a partir da qual ocorre ativação de vias de transdução de sinais que desencadeiam a síntese de proteínas e outros compostos (SHULAEV *et al.*, 2008). Essas proteínas e compostos induzem respostas bioquímicas e fisiológicas que envolvem o fechamento estomático, redução no crescimento celular e na fotossíntese e ativação da respiração (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2007).

O déficit hídrico induz a síntese do fitormônio ácido abscísico (ABA), responsável pelo fechamento dos estômatos e ativação de genes relacionados à seca. Entretanto, alguns genes envolvidos na resposta ao estresse parecem não

responder ao ABA, o que indica a existência de vias ABA-dependentes e ABA-independentes de ativação de genes induzidos por estresses ambientais (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Muitos desses genes foram identificados por análises de *microarrays* em *Arabidopsis*, e seus produtos podem ser classificados em dois grupos. No primeiro encontram-se as proteínas que parecem atuar diretamente na tolerância a estresses abióticos, como chaperonas, proteínas LEA (*Late Abundant Proteins*), osmotinas, proteínas anti-congelamento e de ligação a mRNA, enzimas para biossíntese de osmólitos, aquaporinas, transportadores iônicos, de açúcares e de aminoácidos, enzimas detoxificadoras e proteases (BRAY *et al.*, 2000). O segundo grupo contém fatores envolvidos na regulação ou transdução de sinais durante a resposta ao estresse, sendo denominadas proteínas regulatórias. Estas incluem os fatores de transcrição, proteínas quinases e fosfatases, enzimas do metabolismo de fosfolípidos e outras moléculas sinalizadoras como proteínas de ligação à calmodulina (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2007).

2.3.4 Prolina

O acúmulo de prolina em plantas ocorre em resposta a estresses ambientais como alta salinidade, déficit hídrico, temperaturas extremas, metais pesados, presença de patógenos, anaerobiose, deficiência nutricional, poluição atmosférica e radiação UV (HARE; CRESS, 1997; SARADHI *et al.*, 1995; SIRIPORNADULSIL *et al.*, 2002). A presença do estresse induz a síntese de prolina e inibe a sua degradação, sendo que a concentração do aminoácido nessas condições varia entre as espécies vegetais e depende do nível do estresse ao qual foram expostas (DELAUNEY; VERMA, 1993), podendo acumular 100 vezes mais do que em condições normais (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

Sabe-se que a prolina desempenha um importante papel adaptativo na tolerância das plantas ao estresse, principalmente devido à sua propriedade osmoprotetora. Durante situações de seca e alta salinidade, o seu acúmulo resulta em aumento na osmolaridade da célula, que leva ao influxo de água ou

redução no efluxo e promove a manutenção do turgor necessária para a expansão celular (KAVI KISHOR *et al.*, 2005). Ainda sob condições de estresse osmótico, a integridade de membranas deve ser mantida a fim de evitar a desnaturação protéica. A prolina parece interagir com enzimas e outras proteínas preservando suas estruturas e atividades.

Além de atuar como mediador do ajustamento osmótico e estabilizador de estruturas protéicas (VAN RENSBURG *et al.*, 1993), a prolina é um eficiente removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SMIRNOFF; CUMBES, 1989), desempenhando função de detoxificação durante o estresse oxidativo. Também é fonte de carbono e nitrogênio (HARE; CRESS, 1997), constituinte de proteínas da parede celular de plantas (NANJO *et al.*, 1999), componente da cascata de sinalização molecular do estresse (MAGGIO *et al.*, 2002) e a sua síntese e degradação levam à regulação do pH citoplasmático, promovendo equilíbrio redox na célula.

Em plantas superiores, a prolina é sintetizada via ácido glutâmico (glutamato) ou ornitina. A primeira ocorre no citoplasma e em cloroplastos, e é considerada a principal via, especialmente sob estresse osmótico (DELAUNEY; VERMA, 1993; DELAUNEY *et al.*, 1993; KAVI KISHOR *et al.*, 1995). A biossíntese da prolina tem início com a conversão do glutamato a ácido glutâmico - γ - semialdeído (GSA) pela enzima Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase (P5CS). O GSA é convertido espontaneamente por ciclização a Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato (P5C), que é finalmente reduzido à prolina pela P5C redutase (P5CR) (Figura 01). A partir de ornitina, a prolina pode ser sintetizada por duas rotas, ambas envolvendo a transaminação da ornitina, seguida pela sua ciclização e redução (DELAUNEY; VERMA, 1993). O produto da transaminação do grupo α - amino da ornitina é o α - ceto - δ - aminovalerato que cicla para Δ^1 - pirrolina - 2 - carboxilato (P2C), reduzido à prolina. Alternativamente, a transaminação do grupo δ - amino produz GSA que é convertido à prolina via P5C.

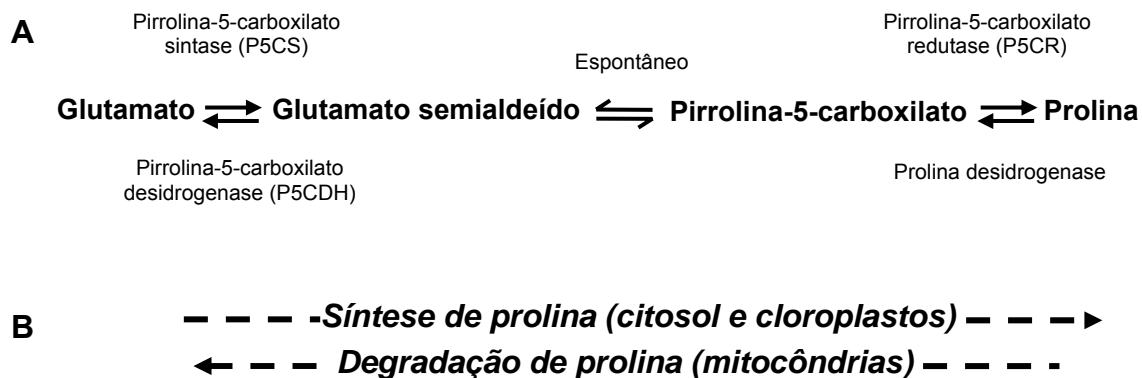


FIGURA 01 - A) Esquema da via metabólica da biossíntese de prolina a partir de glutamato em plantas; B) Compartimentos celulares envolvidos no processo. (Adaptado de VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

Hu *et al.* (1992) demonstraram que a enzima P5CS de *Vigna aconitifolia* apresenta dois domínios catalíticos que apresentam as atividades γ -glutamil quinase e ácido glutâmico - γ -semialdeído desidrogenase, ambas necessárias à conversão de glutamato a GSA, o que confere sua característica bifuncional. A P5CS é limitante na biossíntese de prolina, cujo acúmulo inibe por *feedback* a atividade γ -glutamil quinase da enzima (ZHANG *et al.*, 1995). Estes mesmos autores, com o objetivo de aumentar os níveis de prolina acumulados nos tecidos, fizeram que o mecanismo de *feedback* fosse praticamente eliminado, ao substituírem por alanina o aminoácido fenilalanina da posição 129 da enzima P5CS de *V. aconitifolia*.

A nova enzima mutante, denominada P5CSF129A, vem sendo utilizada em diversos estudos que envolvem a tolerância de plantas ao estresse. Plantas transgênicas de tabaco superexpressando essa enzima, por exemplo, acumularam duas vezes mais prolina do que plantas expressando a P5CS selvagem, e essa diferença foi ainda maior sob estresse salino. A presença da prolina nessas plantas conferiu maior tolerância à salinidade, além de reduzir os níveis de radicais livres em resposta ao estresse osmótico (HONG *et al.*, 2000). Plantas transgênicas do porta-enxerto citrange Carrizo contendo o mesmo gene sob controle de promotor constitutivo 35S CaMV, acumularam cerca de cinco vezes mais prolina do que plantas não transformadas. Plantas transgênicas

apresentaram ajustamento osmótico quando submetidas ao déficit hídrico, sobrevivendo a um período maior em condições severas do estresse (MOLINARI *et al.*, 2004).

O catabolismo da prolina é reprimido durante o estresse osmótico em plantas (DELAUNEY; VERMA, 1993; PENG *et al.*, 1996), porém uma vez recuperadas, a prolina acumulada durante o estresse é oxidada a P5C pela prolina desidrogenase (PDH), também chamada de prolina oxidase, a primeira enzima na via de degradação do aminoácido. O P5C é então convertido a glutamato pela P5C desidrogenase (P5CDH). Ambas as enzimas atuam em mitocôndrias e somente a P5CDH também ocorre no citoplasma (KAVI KISHOR *et al.*, 2005). A via de degradação da prolina também é utilizada para estudos de tolerância ao estresse. Plantas de *A. thaliana* antisense para PDH acumularam níveis maiores de prolina e apresentaram-se tolerantes ao estresse salino e ao congelamento (NANJO *et al.*, 1999).

O acúmulo da prolina não ocorre somente como resposta ao estresse. Estudos demonstram o papel que ela exerce durante o desenvolvimento de plantas, principalmente no florescimento e formação do grão de pólen (PHANG, 1985). Nesse caso, a prolina atua como fonte de energia, já que a oxidação de uma molécula resulta em 30 ATPs (HU *et al.*, 1996). Ainda nesse contexto, é importante saber como a prolina influencia outras vias de energia e metabolismo do carbono durante condições de estresse e recuperação. A biossíntese da prolina regula a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, cuja variação afeta o fluxo de carbono pela via oxidativa da pentose fosfato (HARE; CRESS, 1997). Isso leva à formação de precursores para síntese de fenilpropanóides ou metabólitos secundários durante o estresse e conseqüentemente resulta em mudanças nas propriedades físicas da parede celular e acúmulo de lignina. Por outro lado, a inversão no fluxo de carbono pela via da pentose fosfato leva à síntese de purinas que por sua vez aceleram a divisão celular no período de recuperação.

A ciclagem redox gerada pelo metabolismo da prolina também é um importante mecanismo de defesa antioxidante sob condições de estresse. Isso porque moléculas antioxidantes como glutathiona e o ascorbato devem ser mantidas em estado reduzido, e o NADPH gerado a partir da via da pentose fosfato pode apresentar essa função (HARE, 1998; ALIA *et al.*, 2001).

2.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E O ESTRESSE OXIDATIVO

O termo radical livre se refere a qualquer átomo ou molécula capaz de existir independentemente e que possui um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Diversos tipos de radicais livres estão presentes em sistemas biológicos, dentre eles o hidrogênio atômico, já que possui apenas um elétron, a maioria dos íons dos metais de transição e o oxigênio molecular. A terminologia espécies reativas de oxigênio (ROS) inclui os radicais livres e outras espécies que, embora não possuam elétron desemparelhado, são muito reativas devido a sua instabilidade (RIBEIRO *et al.*, 2005).

O oxigênio molecular (O_2) contém dois elétrons desemparelhados e, apesar de ser considerado um radical livre (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006), apresenta baixa reatividade devido à chamada “restrição de spin”. Os elétrons do oxigênio molecular apresentam spins paralelos e quando o O_2 tenta oxidar outro átomo ou molécula, os spins destes devem estar na mesma condição, o que raramente ocorre em sistemas biológicos. A maioria das moléculas são não-radicais ligadas covalentemente, e os elétrons que formam uma ligação covalente apresentam spins opostos, ocupando o mesmo orbital molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A formação de ROS tem início a partir da eliminação da restrição de spin do O_2 , que sofre rearranjo em seus elétrons. A nova conformação gera o oxigênio singleto (1O_2) que, por possuir dois elétrons em spins opostos, apresenta grande capacidade de oxidação (FOOTE *et al.*, 1985). As outras formas de ROS de importância biológica são produzidas por reduções parciais do oxigênio e incluem: íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}).

Em células de plantas, a produção de ROS se dá em diferentes localizações. A principal fonte dessas moléculas são os cloroplastos, que produzem 1O_2 no fotossistema II e $O_2^{\cdot-}$ nos fotossistemas I e II (ASADA, 2006). Em mitocôndrias ocorre produção de $O_2^{\cdot-}$ nos complexos I e III (MØLLER, 2001), e os peroxissomos são responsáveis pela síntese de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 através de várias reações metabólicas (DEL RIO *et al.*, 2006). Ainda, a NADPH oxidase presente na membrana plasmática produz $O_2^{\cdot-}$, que participa em diversos processos fisiológicos (TORRES; DANGL, 2005). O radical hidroxil pode ser

formado a partir da reação entre H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ em presença de íons metálicos (Fe^{+2} e Cu^{+3}) na chamada reação de Haber-Weiss.

A formação dessas moléculas naturalmente acompanha processos metabólicos em todos os organismos aeróbicos. Sob condições fisiológicas normais, a produção das ROS é controlada por componentes de defesa antioxidante (APEL; HIRT, 2004), descritos posteriormente. Entretanto, o equilíbrio entre a síntese e remoção de ROS pode ser rompido devido ao acúmulo acelerado de ROS, queda na atividade antioxidante ou em ambas as situações, ocasionando a condição de estresse oxidativo. Isto é, quando antioxidantes são esgotados e/ou a formação de ROS aumenta além da capacidade dos sistemas de defesa, dá-se o estresse oxidativo e suas consequências deletérias (SCANDALIOS, 2005). Tal estresse ocorre em condições ambientais adversas como radiação UV, alta luminosidade, temperaturas extremas, estresses mecânicos, exposição a herbicidas, presença de patógenos e déficit hídrico (MITTLER, 2006).

Tanto o déficit hídrico quanto a alta salinidade induzem o estresse osmótico e consequentemente o fechamento estomático, processo este que reduz a difusão de CO_2 para a fotossíntese. Como resultado dessa condição e sob luminosidade intensa, a taxa de produção de poder redutor é maior que a taxa de sua reoxidação, principalmente a partir da redução do CO_2 . Assim, a super-redução do transporte de elétrons fotossintético leva à formação de excesso de ROS nos cloroplastos, o que pode resultar em fotoinibição e danos fotooxidativos (ASADA, 1999).

As consequências do estresse oxidativo ocorrem devido à oxidação de moléculas biológicas pelas ROS. Como citado anteriormente, a grande maioria dessas moléculas são não-radicais e quando reagidas com radicais livres, um novo radical é formado, levando assim à ocorrência de reações em cadeia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Membranas lipídicas, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos são os principais alvos das ROS.

Os ácidos graxos poli-insaturados são os principais componentes de membranas presentes em plantas, e são particularmente suscetíveis à oxidação por $^1\text{O}_2$ e OH^- . Os produtos da oxidação desses ácidos graxos envolvem uma série de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos como o malondialdeído (MDA)

(ILANGO VAN *et al.*, 2006). A peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados leva à diminuição de fluidez das membranas, aumento de perda do conteúdo celular ou da organela, além de causar danos secundários às proteínas de membranas (HALLIWELL, 2006).

As modificações do DNA causadas pelas ROS envolvem principalmente a oxidação das bases dos nucleotídeos. Apenas os radicais OH^- e $^1\text{O}_2$ são reativos nesse caso (WISEMAN; HALLIWELL, 1996), e o produto da oxidação de DNA mais observado é a 8 - hidroxiguanina. Além das alterações diretas, as ROS também podem modificar indiretamente o DNA. Um tipo comum de dano envolve a conjugação do MDA, produzido pela peroxidação lipídica, com guanina. Ainda, a oxidação do DNA pode levar a alterações na metilação de citosinas, que é importante para a regulação da expressão gênica (HALLIWELL, 2006).

As principais formas de modificações sofridas pelas proteínas através dos radicais livres são: a oxidação de aminoácidos que contêm enxofre, como cisteína e metionina; carbonilação de proteínas com resíduos de arginina, histidina, lisina, prolina e tirosina, cujas oxidações resultam em grupos carbonila livres (LEVINE *et al.*, 1994); oxidação do triptofano (SHACTER, 2000); e a nitrosilação, que envolve a formação de peroxinitrito (ONOO^-) a partir da reação de óxido nítrico (NO^*) com $\text{O}_2^{\cdot-}$ (COSTA *et al.*, 2003). Pode ocorrer ainda a interação dos produtos de oxidação de ácidos graxos com proteínas, que causam inibição da atividade de enzimas como, por exemplo, a piruvato desidrogenase em mitocôndrias (SWEETLOVE *et al.*, 2002). Proteínas do aparato fotossintético são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, como a proteína D1 do PSII (SCHELLER; HALDRUP, 2005). Além desta, foi observado que os centros de reação do PSI são degradados em condições de estresse por frio e alta luminosidade, liberando íons ferro dos tilacóides para o estroma. Devido à presença do íon metálico, ocorre a formação de OH^- , que pode danificar proteínas do estroma, como a Rubisco (MØLLER *et al.*, 2007).

A oxidação de carboidratos não é considerada deletéria, uma vez que os produtos não danificam componentes celulares (MØLLER *et al.*, 2007). O radical hidroxil reage com carboidratos livres como açúcares e polióis, produzindo principalmente ácido fórmico como produto da oxidação (ISBELL *et al.*, 1973). Considerando que polióis como o manitol agem como uma primeira barreira

contra as ROS, evitando que estas danifiquem moléculas biologicamente mais importantes (SHEN *et al.*, 1997), a presença de carboidratos pode conferir proteção contra o estresse oxidativo, o que será discutido em tópicos subsequentes.

Assim, a oxidação de biomoléculas através do acúmulo de ROS durante o estresse oxidativo afeta seriamente o metabolismo de plantas, resultando em alterações celulares como danos em membranas, perda de funções das organelas, redução na eficiência metabólica e na fixação do carbono, perda de eletrólitos e mutações, que levam a disfunções fisiológicas, podendo acarretar em morte celular (Figura 02) (SCANDALIOS, 2005).

Agentes estressantes

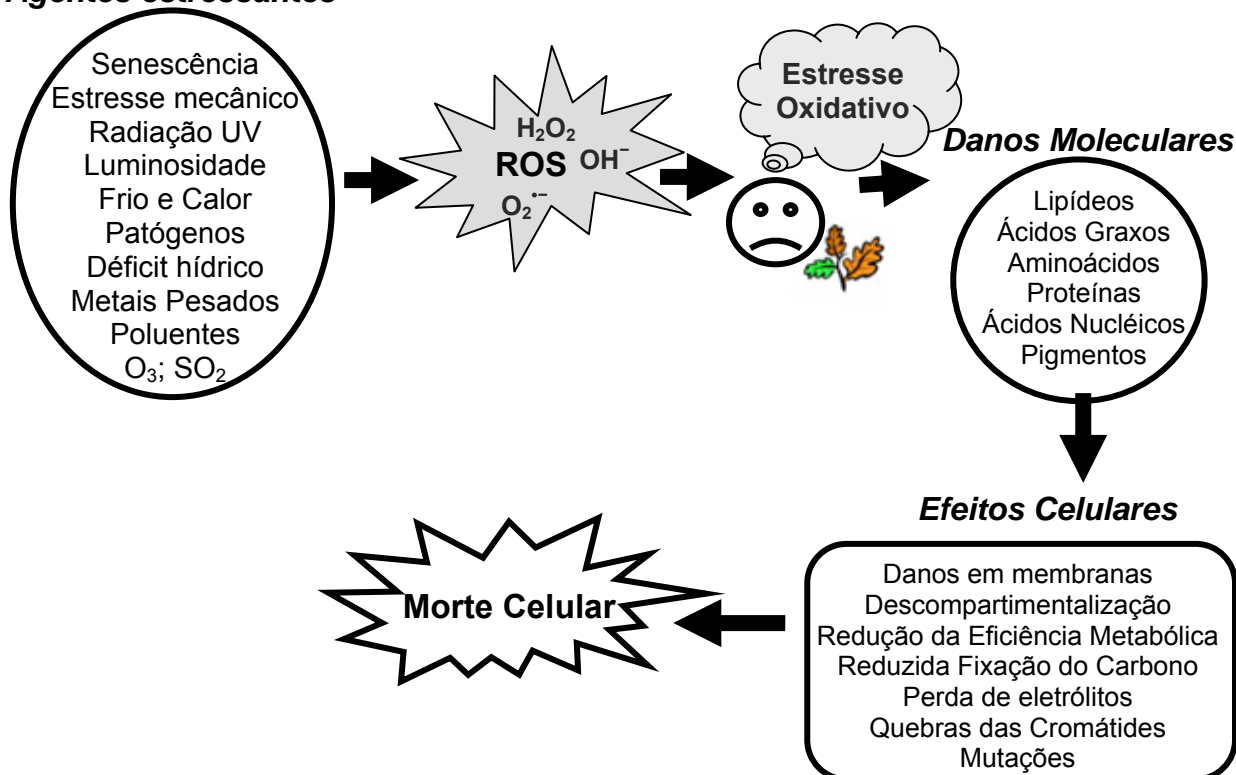


FIGURA 02 - Esquema indicando alguns dos agentes estressantes indutores do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as consequências biológicas que desencadeiam uma série de disfunções fisiológicas que podem acarretar em morte celular (Adaptado de SCANDALIOS, 2005).

2.4.1 Sistemas antioxidantes

Para minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo, os organismos aeróbios desenvolveram múltiplas linhas de defesa que incluem sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Tal multiplicidade é necessária uma vez que as ROS são produzidas em diferentes compartimentos celulares e extracelulares, e também porque as espécies reativas apresentam diferentes propriedades como solubilidade, capacidade de difusão e nível de reatividade com moléculas biológicas (PERL-TREVES; PERL, 2002).

2.4.1.1 Enzimas antioxidantes

Uma série de passos de detoxificação é requerida para evitar a conversão de uma espécie reativa em outra mais nociva. A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada uma primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo por converter o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (FRIDOVICH, 1995). Baseando-se no metal co-fator utilizado pela enzima, as SODs são classificadas em três grupos: Ferro SOD (FeSOD), localizada nos cloroplastos, manganês SOD (MnSOD) em mitocôndrias, e cobre-zinco SOD (Cu/ZnSOD), presente em cloroplastos, no citosol e possivelmente no espaço extracelular (SCANDALIOS, 2005). Em plantas, mais de uma isoforma das enzimas é encontrada nos diferentes compartimentos celulares, o que indica uma maior complexidade antioxidante nesses organismos (SCANDALIOS, 1997).

O produto da dismutação do superóxido pela SOD, o H_2O_2 , deve ser removido a fim de evitar sua conversão em radicais mais reativos, como o OH^{\bullet} (PERL-TREVES; PERL, 2002). Para isso, diversas enzimas como catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) atuam reduzindo o H_2O_2 a H_2O . Assim como as SODs, a CAT e a APX também apresentam diferentes isoformas. Em plantas, as CATs são encontradas nos peroxissomos, glioxissomos, citosol e mitocôndrias (PERL-TREVES; PERL, 2002), e as isoformas da APX estão presentes no citosol, em membranas dos peroxissomos e em cloroplastos, sendo que nesse caso, uma

isoforma está presente no estroma e outra está associada às membranas dos tilacóides (MIYAKE; ASADA, 1992).

Diferentemente da CAT, que degrada diretamente o H_2O_2 sem consumir agentes redutores celulares, a detoxificação pela APX ocorre com a oxidação de ascorbato, reação que resulta em monodeidroascorbato (MDHA) e H_2O . A regeneração do ascorbato é mediada pela monodeidroascorbato redutase (MDHAR) utilizando NAD(P)H como equivalente redutor (FOYER; HALLIWELL, 1976; NAKANO; ASADA, 1980).

Diversos estudos demonstraram ocorrer mudanças nas atividades das enzimas antioxidantes de plantas em resposta à seca, altas temperaturas e salinidade, sugerindo que o aumento dessas atividades possa estar intimamente relacionado à tolerância a esses estresses. A atividade de SOD, APX e glutathione redutase (GR), por exemplo, aumentou em genótipos tolerantes de trigo e manteve-se ou reduziu em genótipos sensíveis em resposta ao déficit hídrico (LASCANO *et al.*, 2001).

Khanna-Chopra e Selote (2006) também observaram que uma cultivar de trigo apresentou maior tolerância ao déficit hídrico do que outra suscetível. Maiores valores de potencial de água e de conteúdo relativo de água observados nas plantas tolerantes durante o estresse possivelmente ocorreram devido à maior atividade de enzimas de remoção de H_2O_2 , como peroxidases, APX e CAT.

2.4.1.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Os componentes do sistema não-enzimático de remoção de ROS envolvem compostos com propriedades antioxidantes intrínsecas, como o ascorbato (Vitamina C), o α -tocoferol (Vitamina E), carotenóides, a glutathione e polióis ou alcoóis de açúcar (PERL-TREVES; PERL, 2002).

O ascorbato está presente em toda a célula vegetal e, além de atuar como substrato para a APX na remoção de H_2O_2 , também protege por reagir com $O_2^{\cdot-}$, OH^- e hidroperóxidos lipídicos (YU, 1994). Apesar de ser solúvel em água, este também age nas membranas dos tilacóides protegendo ou regenerando carotenóides e tocoferóis oxidados.

O α -tocoferol é encontrado em membranas celulares, principalmente nos tilacóides. Sua estrutura e localização conferem a sua função de estabilizador de membranas (HESS, 1993), por capturar radicais peroxilipídicos, auxiliando na organização da bicamada lipídica. Dentre os carotenóides, o β -caroteno apresenta função única de proteção aos fotossistemas, tendo nesse caso como principal papel a captura da energia da clorofila no estado excitado, o que previne a formação do oxigênio singlete (PARKER; JOYCE, 1967).

A glutathiona (GSH) efetivamente reduz e detoxifica diversas espécies reativas. A GSH também atua como substrato em reações enzimáticas, inclusive as envolvidas na regeneração do ascorbato (YU, 1994). Os alcoóis de açúcar, como o manitol, são acumulados durante estresses ambientais. Nessas situações, essas moléculas não apenas funcionam como osmoprotetores, mas também como antioxidantes (SMIRNOFF; CUMBES, 1989).

2.4.2 Prolina e a proteção contra o estresse oxidativo

Como foi descrito anteriormente, existe um equilíbrio delicado entre a síntese e a remoção de ROS nas células vegetais. Esse equilíbrio normalmente é rompido em condições ambientais adversas, induzindo o estado de estresse oxidativo, situação que requer mecanismos que amenizem o processo autocatalítico sofrido pelas plantas (SCANDALIOS, 2005). Durante estresses abióticos, ocorre acúmulo do aminoácido prolina (DELAUNEY; VERMA, 1993), adicionalmente à ativação da atividade de enzimas antioxidantes. Dentre os diversos papéis que a prolina exerce durante a resposta ao estresse, cabe ressaltar adiante a sua função protetora contra danos oxidativos.

Devido às suas propriedades químicas, a prolina pode remover $^1\text{O}_2$ (ALIA *et al.*, 1997) e radicais OH^\cdot (SMIRNOFF; CUMBES, 1989), sendo por isso capaz de estabilizar proteínas, DNA e membranas. A pirrolidina, a amina cíclica que forma o anel de cinco membros da prolina, apresenta IP (capacidade de fornecer um elétron) consideravelmente baixo, o que confere ao aminoácido a capacidade de formar complexos de transferência de carga, removendo $^1\text{O}_2$ com eficiência (AUE *et al.*, 1976). Além disso, a prolina, assim como o sorbitol, manitol e mio-

inositol, reagem com radicais OH^- formando um radical mais estável (SMIRNOFF; CUMBES, 1989).

Nos últimos anos, tem-se dado mais enfoque ao papel que a prolina exerce na proteção contra o estresse oxidativo em diversos organismos. Chen e Dickman (2005), por exemplo, demonstraram que a presença de prolina inibiu a apoptose em células do fungo patogênico de alfafa *Colletotrichum trifolii*, provavelmente por ativar enzimas antioxidantes como a CAT. Em mamíferos, anormalidades no metabolismo de prolina têm sido relacionadas ao desenvolvimento de doenças. A indução de mutações na prolina desidrogenase (PDH), por exemplo, foi associada à hiperprolinemia em pacientes esquizofrênicos (JACQUET, 2002). Tripathi e Gaur (2004) também constataram que a presença de prolina aliviou os sintomas de toxicidade por Cu e Zn em *Scenedesmus* sp, por remover radicais livres.

Em plantas, a manipulação de níveis endógenos e exógenos de prolina é amplamente explorada e resulta em dados importantes, porém, bastante variados entre os pesquisadores, principalmente ao avaliar a relação da prolina às atividades das enzimas antioxidantes (KOCSY *et al.*, 2005; HOQUE *et al.*, 2007a, HOQUE *et al.*, 2007b; OZDEN *et al.*, 2009).

Plantas de soja foram transformadas geneticamente com o gene que codifica para a enzima P5CR, nas direções senso (S) e antisenso (AS), sendo avaliadas durante e após um período de estresse térmico e déficit hídrico associado (KOCSY *et al.*, 2005). Nesse trabalho foram avaliadas as atividades das enzimas SOD, APX e GR, além do conteúdo de ascorbato e glutatona. O maior acúmulo de prolina obtido em plantas transgênicas S conferiu menor porcentagem de danos e maior conteúdo relativo de água do que plantas controle e AS, que apresentaram os maiores danos. Não houve diferença na atividade de SOD entre as plantas, havendo queda durante o estresse e a recuperação. As atividades de APX e GR foram significativamente maiores nos transformantes AS. O maior nível de ascorbato, associado à prolina acumulada nas plantas S parece ter sido suficiente para a redução efetiva das ROS, não havendo participação das enzimas antioxidantes nesse caso.

Molinari *et al.* (2007), ao avaliarem plantas transgênicas de cana-de-açúcar com expressão estresse-induzida do gene *P5CS* submetidas ao déficit hídrico, observaram que a prolina atuou mais como um agente antioxidante do que como

um osmoprotetor. Após nove dias sem irrigação, não houve ajustamento osmótico nessas plantas, porém, elas apresentaram eficiência fotoquímica do PSII 65% maior do que plantas controle. Além disso, folhas de plantas transgênicas tratadas com paraquat, um potente gerador de ROS, apresentaram maiores conteúdos de clorofila, quando comparadas às controle. Esses dados sustentam a hipótese de que a prolina opera na remoção de radicais livres e consequentemente na proteção do aparato fotossintético.

A aplicação exógena de prolina também confere proteção contra o estresse oxidativo em células vegetais. Hoque *et al.* (2007a; 2007b; 2008) observaram que a prolina aliviou os sintomas do estresse oxidativo induzido por salinidade em cultura de células de tabaco. Resultados obtidos nesses trabalhos indicaram que a prolina levou à ativação de enzimas antioxidantes, como as do ciclo glutathionascorbato (APX, MDHAR e GR, por exemplo) (HOQUE *et al.*, 2007b), CAT e peroxidase (HOQUE *et al.*, 2007a).

O efeito da prolina exógena no sistema antioxidante de folhas de videira submetidas ao estresse oxidativo por H_2O_2 foi avaliado (OZDEN *et al.*, 2009). Durante a imposição do estresse, menores níveis de peroxidação lipídica foram observados em presença do aminoácido, onde as atividades de SOD e CAT foram menores do que na ausência. Porém, as atividades da peroxidase e APX foram maiores na presença de prolina. Assim, a aplicação de prolina exógena parece proporcionar um efeito positivo no sistema antioxidante enzimático, particularmente na ativação de APX e peroxidase em resposta ao estresse oxidativo ocasionado pelo H_2O_2 .

3 REFERÊNCIAS

ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Citros, 2008. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/>>. Acesso em: 02/10/08.

ALIA, J. M.; SARADHI, P. P.; MOHANTY, P. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 38, p. 253–257, 1997.

ALIA, J. M.; MOHANTY, P.; MATYSIK, J. Effect of proline on the production of singlet oxygen. **Amino Acids**, n. 21, p. 195–200, 2001.

ANGELOCCI, L. R.; VALANCOGNE, C. Leaf area and water flux in apple trees. **Journal of Horticultural Science**, v.68, n.2, p.299-307, 1993.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–99, 2004.

ASADA, K. The Water–Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601–639, 1999.

ASADA K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141 p. 391–396, 2006.

AUE, D. H.; WEBB, H. M.; BOWERS, M. T. Quantitative proton affinities, ionization potentials, and hydrogen affinities of alkylamines. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 98, p. 311, 1976.

BARRS, H. D. Determination of water deficits in plant tissues. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed). **Water deficits and plant growth**. New York, NY: Academic Press, 235–368. 1968.

BAKER, J. M.; BAVEL, C. H. M VAN. Measurement of mass flow of water in the stems of herbaceous plants. **Plant, Cell and Environment**, v.10, p.77-782, 1987.

BERETTA, M. J. G.; POMPEU JÚNIOR, J.; DERRICK, K. S.; LEE, R. F.; HEWITT, B.; BARTHE, G. Evaluation of roostocks in Brasil for field resistance to declínio. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., Acireale, 1992. **Proceedings**. Acireale: International Society of Citriculture, 1994. p. 841-843.

BERGUER, R. D. A causa e o controle do declínio dos citros. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 1, p. 79-90, 1998.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: GRUISSEM, W.; BUCHANNAN, B.; JONES, R. (Eds.) **Responses to Abiotic Stresses**. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1158-1249.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30 p. 239–264, 2003.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for watersaving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2365–2384, 2004.

CHEN, C; DICKMAN, M. B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. **PNAS**, v. 102, n. 9, p. 3459–3464, 2005.

CITROLIMA, 2005. Disponível em:

<<http://www.citrolima.com.br/portaenxertos/swingle.htm>>. Acesso em: 12/01/09.

COHEN, Y.; FUCHS, M.; GREEN, G. C. Improvement of the heat-pulse method for determining sap flow in trees. **Plant Cell Environment**, v. 4, p. 391-397, 1981.

COSTA, N. J. Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 5, p. 291–305, 2003.

CUNHA, G. R.; BERGAMASCHI, H. Efeitos da disponibilidade hídrica sobre o rendimento das culturas. In: _____. **Agrometeorologia aplicada à irrigação**. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1992. p. 125.

DERAL/SEAB - Departamento de Economia Rural da Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná, 2008. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br>>. Acesso em: 01/10/08.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

DELAUNEY, A. J.; HU, C. A.; KISHOR, P. B.; VERMA, D. P. S. Cloning of ornithine δ -aminotransferase cDNA by *trans*-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 18673-18678, 1993.

DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 330–335, 2006.

DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. **The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis**. v. 1. Amsterdam: Elsevier, 21–26. 1996.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRÜGER, G. H.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1211-1224, 2004.

DOORENBOS, J.; KASSAM, A. H. **Efeito da água no rendimento das culturas**. Tradução: GHEYI, H. R. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 1994. 306 p. (Estudos da FAO, Irrigação e Drenagem, 33).

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em 25/04/06.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 13/07/08.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT, 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 30/09/08.

FERERES, E.; GOLDHAMER, D. A. Suitability of stem diameter variations and water potential as indicators for irrigation scheduling of almond trees. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 78, p. 139–144, 2003.

FLEXAS, J. ; BOTA, J.; CIFRE, J.; ESCALONA, J. M.; GALMÉS, J.; GULÍAS, J.; LEFI, E.; MARTÍNEZ-CAÑELLAS, S. F.; MORENO, M. T.; RIBAS-CARBÓ, M.; RIERA, D.; SAMPOL, B.; MEDRANO, H. Understanding down-regulation of photosynthesis under water stress: future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. **Annals of Applied Biology**, n. 144, p. 273–283, 2004.

FLEXAS, J.; BOTA, J; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBÓ, M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 343–352, 2006.

FOOTE, C. S.; VALENTINE, J. S.; GREENBERG, A.; LIEBMAN, J. F. (Eds.) **Active Oxygen in Chemistry**. New York: Chapman and Hall, 1985.

FOYER, C. H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, v. 133, p. 21-25, 1976.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and SODs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97–112, 1995.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. Araraquara, 2003. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/>>. Acesso em: 17/04/03.

FUNDECITRUS. **Morte súbita estimula irrigação**. Araraquara: São Francisco Gráfica e Editora, mar/abr. 2004, p. 12-13.

FUNDECITRUS. **MSC ainda está viva**. Araraquara: São Francisco Gráfica e Editora, nov/dez. 2007, p. 8-9.

GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Production of interstocked ‘Pera’ sweet orange nursery trees on ‘Volkamer’ lemon and ‘Swingle’ citrumelo rootstocks. **Scientia Agricola**, v.63, n.1, p.5-10, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4 ed., Oxford: Clarendon Press, 2006.

HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312–322, 2006.

HAMDY, A.; RAGAB, R.; SCARASCIA-MUGNOZZA, E. Coping with water scarcity: water saving and increasing water productivity. **Irrigation and Drainage**, v. 52, p. 3–20, 2003.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, vol 21, p. 79-102, 1997.

HARE, P. D. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant and Cell Environment**, v. 21, p. 535-553, 1998.

HARTUNG, W.; SAUTER, A.; HOSE, E. Absciscic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 27–32, 2002.

HEILMAN, J. L.; HAM, J. M. Measurement of mass flow rate of sap in *Ligustrum japonicum*. **Hortscience**, v. 25, n. 4, p. 465-467, 1990.

HESS, J. L. Vitamin E, alpha-tocopherol. In: ALSCHER, R. G.; HESS, R. G. (Eds.) **Antioxidants in Higher Plants**. Boca Raton, FL: CRC, 1993, p. 111-134.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDANI, A.; JAOUA, L.; SAVOURÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 196, p. 746-752, 2005.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, n. 122, p. 1129-1136, 2000.

HOQUE, M. A.; OKUMA, E.; BANU, M. N. A.; NAKAMURA, K.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 5, p. 553-561, 2007a.

HOQUE, M. A.; BANU, M. N. A.; OKUMA, E.; AMAKO, K.; NAKAMURA, K.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate–glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 11, p. 1457-1468, 2007b.

HOQUE, M. A.; BANU, M. N. A.; NAKAMURA, K.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 813-824, 2008.

HU, C. A.; DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. **PNAS**, v. 89, p. 9354-9358, 1995.

HU, C. A.; LIN, W. W.; VALLE, D. Cloning, characterization and expression of cDNAs encoding human Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 9795–9800, 1996.

HSIAO, T. C.; XU, L.K. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 350, p. 1595-1616, 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística, 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 29/09/08.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística, 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 30/09/08.

IEA – Instituto de Economia Agrícola, 2008. Disponível em: <<ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/mercado/laranja0508.pdf>>. Acesso em 05/01/09.

ILANGO VAN, G.; VENKATAKRISHNAN, C. D.; BRATASZ, A.; OSINBOWALE, S.; CARDOUNEL, A. J.; ZWEIER, J. L.; KUPPUSAMY, P. Heat shock-induced attenuation of hydroxyl radical generation and mitochondrial aconitase activity in cardiac H9c2 cells. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 290, C313–24, 2006.

ISELL, H. S.; FRUSH, H. L.; MARTIN, E. T. Reactions of carbohydrates with hydroperoxides. 1. Oxidation of aldoses with sodium peroxide. **Carbohydrate Research**, v. 26, p. 287–295, 1973.

JACQUET, H.; RAUX, G.; THIBAUT, F.; HECKETSWEILER, B.; HOUY, E.; DEMILLY, C.; HAOUZIR, S.; ALLIO, G.; FOULDRIN, G.; DROUIN, V.; BOU, J.; PETIT, M.; CAMPION, D.; FRÉBOURG, T. *PRODH* mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. **Human Molecular Genetics**, v. 11, p. 2243–2249, 2002.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals of Botany**, v. 90, p. 301–313, 2002.

JONES, H. G. Application of thermal imaging and infrared sensing in plant physiology and ecophysiology. **Advances in Botanical Research**, v. 41, p. 107–163, 2004.

JONES, H. G. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 119–130, 2007.

KAVI KISHOR, P. B.; HONG, Z.; MIAO, G. H.; HU, C. A. A.; VERMA, D. P. S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387–1394, 1995.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424–438, 2005.

KHANNA-CHOPRA, R.; SELOTE, D. S. Acclimatation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than –susceptible wheat cultivar under field conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 276-283, 2007.

KIRKHAM, M. B. **Principles of soil and plant water relations**. Burlington, MA: Elsevier Academic Press. 2004.

KOCSY, G.; LAURIE, R.; SZALAI, G.; SZILAGYI, V.; SIMON-SARKADI, L.; GALIBA, G.; DE RONDE, J. A. Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stress. **Physiologia Plantarum**, v. 124, p. 227–235, 2005.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000, 531 p.

LASCANO, H. R.; ANTONICELLI, G. E.; LUNA, C. M.; MELCHIORRE, M. N.; GÓMEZ, L. D.; RACCA, R. W.; TRIPPI, V. S.; CASANO, L. M. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 1095–1102, 2001.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LUDLOW, M. M.; POWLES, S. B. Effects of photoinhibition induced by water stress on growth and yield of grain sorghum. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 179-194, 1988.

MACHADO, E. C.; QUAGGIO, J. A.; LAGÔA, A. M. M. A.; TICELLI, M.; FURLANI, P. R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 1, p. 53-57, 1994.

MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; RIBEIRO, R. V.; MEDINA, C. L.; STUCHI, E. S.; PAVANI, L. C. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranjeira 'Natal'. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 373-379, 2007.

MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J. I.; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M. L.; HASEGAWA, P. M.; JOLY, R. J.; BRESSAN, R. A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **The Plant Journal**, v. 31, p. 699–712, 2002.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-58, 2005.

MARIN, F. R. **Evapotranspiração, transpiração e balanço de energia em um pomar de lima ácida 'Tahiti'**. Dissertação (Mestrado) Piracicaba: USP/ESALQ, 2000, 74 p.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.

MEDINA, C. L. **Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranjeira 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002, 147 p.

MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeira 'Valência' enxertada sobre limoeiro 'Cravo' e trifoliata e submetida à deficiência hídrica. **Bragantia**, v. 57, n. 1, p. 15-22, 1998.

MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranja 'Valência' sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 1, p. 29-34, 1999.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 15–19, 2006.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid-Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in Thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, v. 33, n. 5, p. 541-553, 1992.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; LEITE JÚNIOR, R. P.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Obs.x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, p. 1375-1381, 2004.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, J. F. P. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218 – 229, 2007.

MØLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561–591, 2001.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459–481, 2007.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. **Plant and Cell Physiology**, v. 21, p. 1295-1307, 1980.

NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, n. 18, v. 2, p. 185-193, 1999.

NAOR, A.; COHEN, S. Sensitivity and variability of maximum trunk shrinkage, midday stem water potential, and transpiration rate in response to withholding irrigation from field-grown apple trees. **Hortscience**, v. 38, p. 547–551, 2003.

NEVES, M. F.; JANK, M. S. (Org.) Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: A agenda 2015. **PENSA/USP/ICONE**, São Paulo, 2006.

NOLTE, K. D.; HANSON, A. D. Proline accumulation and methylation to proline betaine in *Citrus*: Implications for genetic engineering of stress resistance. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 22, n. 1, p. 8-13, 1997.

ORTOLANI, A.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; ALFONSI, R. R. Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. A. (Eds.) **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 153-195.

OZDEN, M.; DEMIREL, U.; KAHRAMAN, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 163–168, 2009.

PARKER, C. A.; JOYCE, C. A. Delayed fluorescence and some properties of the chlorophyll triplets. **Photochemistry and Photobiology**, v. 6, p. 395, 1967.

PASSIOURA, J. B. Drought and drought tolerance. In: BELHASSEN, E. (Ed.) **Drought tolerance in higher plants**. Kluwer Academic Press: Netherlands, 1997, p. 1-7.

PENG, Z.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes control levels during and after osmotic stress in plants. **Molecular and General Genetics**, v. 253, p. 334–341, 1996.

PERL-TREVES, R.; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. In: _____. **Oxidative Stress in Plants**, 2002.

PHANG, J. M. The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 25, p. 91–132, 1985.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUES, O., VIEGAS, F. (Eds.) **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. 2 ed., v.1, 492p.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.) **Citros**. Campinas: 2005. Cap. 4.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e o efeito das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

SARADHI, P. P.; ALIA, J. M.; ARORA, S.; PRASAD, K. V. S. K. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 209, p. 1-5, 1995.

SCANDALIOS, J. G. Molecular Genetics of Superoxide Dismutases in Plants. In: _____. **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidative Defenses**. Cold Spring Harbor: Plainview, 1997, p. 527-568.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHELLER, H. V.; HALDRUP, A. Photoinhibition of photosystem I. **Planta**, v. 221, p. 5–8, 2005.

SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.) **Citros**. Campinas: 2005. Cap. 11.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**, v. 32, p. 307–326, 2000.

SHEN, B. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 113; p. 1177–1183, 1997.

SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 132, p. 199–208, 2008.

SIRIPORNADULSIL, S.; TRAIN, S.; VERMA, D. P. S.; SAYRE, R. T. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. **Plant Cell**, v. 14, p. 2837–2847, 2002.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

STEUDLE, E. Water uptake by roots: effects of water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 350, p. 1531-1542, 2000.

SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia Plantarum** v. 126, p. 45–51, 2006.

SWEETLOVE, L. J.; HEAZLEWOOD, J. L.; HERALD, V.; HOLTZAPFFEL, R.; DAY, D. A.; LEAVER, C. J.; MILLAR, A. H. The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. **The Plant Journal**, v. 32, p. 891–904, 2002.

SYVERTSEN, J. P.; LLOYD, J. J. Citrus. In: SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P. C. (Ed.) **Handbook of environmental physiology of fruit crops**: subtropical and tropical crops. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 65-100.

TARDIEU, F.; SIMONNEAU, T. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 419–432, 1998.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 397–403, 2005.

TRIPATHI, B. N.; GAUR, J. P. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. **Planta**, v. 219, n. 3, p. 397-404, 2004.

USDA – United States Department of Agriculture, 2008. **Citrus: World Markets and Trade**. Disponível em: < <http://www.fas.usda.gov> > . Acesso em: 25/01/09.

VAN RENSBURG, L.; KRÜGER, G. H. J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and

chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 188-194, 1993.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, 2008.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523-539, 2006.

VIANA, M. M.; BRAGA, D. Cenário continua positivo em 2008. **Hortifrutibrasil**, Piracicaba, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/64/citros.pdf>>. Acesso em: 07/10/08.

WARREN, C. R.; LIVINGSTON, N. J.; TURPIN, D. H. Water stress decreases the transfer conductance of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziensis*) seedlings. **Tree Physiology**, v. 24, p. 971–979, 2004.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**, v. 313, p. 17–29, 1996.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 88–94, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221–227, 2007.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 217, p. 1214-1222, 1982.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139-162, 1994.

ZHANG, C. S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, n. 270, p. 20491-20496, 1995.

ZHANG, J.; NGUYEN, H. T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal of Experimental Botany**, n. 50, p. 291–302, 1999.

4 ARTIGO

Relações hídricas e trocas gasosas em plantas transgênicas de
citrumelo 'Swingle' com alto acúmulo de prolina submetidas ao déficit
hídrico

RESUMO

O déficit hídrico é um dos principais fatores abióticos que afetam o desempenho de diversas espécies cultivadas em todo o mundo. Em plantas, o déficit hídrico desencadeia respostas bioquímicas e fisiológicas que envolvem o fechamento estomático, a redução da fotossíntese e o acúmulo de osmoprotetores, como o aminoácido prolina, que desempenha um papel importante no ajustamento osmótico, estabilização de proteínas e remoção de radicais livres. Neste trabalho foi avaliado o efeito da prolina na tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas do porta-enxerto para citros citrumelo 'Swingle' contendo o gene mutante *P5CSF129A*, que codifica para a enzima-chave da biossíntese de prolina. Plantas controle não transformadas e plantas transgênicas foram submetidas a um período de 14 e 16 dias sem irrigação, respectivamente. O potencial hídrico das folhas, taxas fotossintéticas e de transpiração, condutância estomática e fluxo de seiva do xilema foram avaliados. Os pontos de coleta das folhas para a determinação do teor de prolina foram determinados a partir de medidas de potencial total de água, que representaram os seguintes níveis de estresse: Sem estresse (SE; $\Psi_t = -1,3$ MPa), estresse moderado (EM; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), estresse severo (ES; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa) e recuperação (REC; 24 h após reidratação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Plantas transgênicas apresentaram valores 2,5 vezes maiores de prolina do que plantas controle nas condições SE e EM, sendo que plantas controle atingiram níveis similares somente no ES. Houve ajustamento osmótico em plantas transgênicas até o 12º dia de restrição de água, enquanto que plantas controle apresentaram potencial de pressão nulo no nono dia. Maiores taxas de fotossíntese, condutância estomática e transpiração também foram quantificadas em plantas transgênicas, indicando melhor manutenção da abertura estomática e eficiência do uso da água do que em plantas controle. Estes resultados sugerem que a prolina desempenha um importante papel na tolerância de plantas ao déficit hídrico, não apenas por mediar o ajustamento osmótico, mas também devido ao seu papel removedor de radicais livres.

Palavras-chave: Porta-enxertos; ajustamento osmótico; P5CS; tolerância à seca.

Water relations and gas exchange in transgenic 'Swingle' citrumelo overaccumulating proline under drought stress

ABSTRACT

Water deficit is one of the major abiotic factors affecting agriculture in different areas in the world. In plants, water deficit triggers a series of biochemical and physiological responses involving stomatal closure, reduction in photosynthesis rates and production and accumulation of osmolytes, such as proline, which plays an important role in osmotic adjustment, protein stabilization and ROS scavenging. This work evaluated proline effect in drought tolerance in transgenic 'Swingle' citrumelo rootstocks transformed with the *P5CSF129A* gene, coding for the key-enzyme for proline synthesis. Non-transformed control and transgenic plants were submitted to a 14 and 16-day period, respectively. Leaf water potential, photosynthetic and transpiration rates, stomatal conductance and xylem sap flow were evaluated. Proline content was evaluated in leaves collected based on their total water potential, representing the following stress levels: Irrigated (SE; $\Psi_t = -1.3$ MPa), moderate stress (EM; $\Psi_t = -2.3$ to -2.5 MPa), severe stress (ES; $\Psi_t = -3.8$ to -3.9 MPa) and recovery (REC; 24 h after re-irrigation; $\Psi_t = -1.3$ to -1.9 MPa). Transgenic plants accumulated 2.5-fold higher proline content than non-transformed control plants in the SE and EM conditions. Osmotic adjustment was observed in transgenic plants until 12 days after withholding water, while non-transformed control plants presented negative pressure potential after 9 days of water deficit. Higher photosynthetic rates, stomatal conductance and transpiration were also observed in transgenic plants, demonstrating better maintenance of stomatal opening than non-transformed control plants. These results suggest that proline plays an important role for drought stress tolerance in plants, not only by mediating osmotic adjustment, but also due to its ROS scavenging function.

Key-words: Rootstocks; osmotic adjustment; P5CS; drought tolerance.

4.1 INTRODUÇÃO

Os citros são as frutas mais cultivadas mundialmente, sendo produzidas em mais de 140 países (FAO, 2004). O setor citrícola brasileiro apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país (NEVES; JANK, 2006). Os porta-enxertos influenciam diretamente diversos aspectos fisiológicos e de desenvolvimento da copa, assim como conferem tolerância a pragas, doenças e estresses ambientais (POMPEU JUNIOR, 2005). A utilização em larga escala de limão 'Cravo', presente em 80% dos pomares, representa uma vulnerabilidade da citricultura brasileira devido aos potenciais riscos causados por mudanças climáticas ou pelo surgimento de novas doenças, como foi o caso da Morte Súbita dos Citros (MSC), o que torna necessário o processo de diversificação de germoplasma. Dentre os principais porta-enxertos alternativos ao limão 'Cravo', o citrumelo 'Swingle' apresenta vantagens como a tolerância à MSC, porém é sensível à seca (FUNDECITRUS, 2003).

Apesar das regiões citrícolas brasileiras apresentarem boa distribuição de chuvas (DOORENBOS; KASSAM, 1994), períodos de déficit hídrico são frequentes e prejudicam a cultura em diferentes aspectos (ORTOLANI *et al.*, 1991). O fechamento dos estômatos em plantas estressadas leva à diminuição nas taxas fotossintéticas e de crescimento. A abscisão de folhas, frutos e flores (SENTELHAS, 2005), além do agravamento de doenças como o declínio (BERGUER, 1998) e a CVC (MEDINA, 2002; MACHADO *et al.*, 2007), também são fatores que afetam a produtividade durante a seca.

Em plantas, a resposta ao estresse osmótico inicia-se a partir da percepção do baixo potencial hídrico nas membranas celulares, que desencadeia uma série de eventos envolvidos na ativação de genes e síntese de compostos que induzem uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas. Durante o estresse, ocorre diminuição da condutância estomática e aumento no comprimento das raízes, de forma a melhorar o desempenho das espécies cultivadas. Porém, há menor captação de CO₂ e a energia requerida para o crescimento de raízes é desviada de tecidos fotossintéticos e reprodutivos. Em casos de deficiência hídrica severa, os mecanismos citados não oferecem mais proteção contra os efeitos do baixo

potencial hídrico (VERSLUES *et al.*, 2006). Como forma de tolerância, as plantas devem evitar a dessecação celular, promovendo o influxo de água, através do acúmulo de solutos na célula, que reduz o potencial osmótico, em processo denominado ajustamento osmótico (ZHANG *et al.*, 1999).

Dentre os osmoprotetores, o aminoácido prolina é um dos principais solutos acumulados durante o estresse, e além de atuar como mediador do ajustamento osmótico possui função de estabilizar proteínas (VAN RENSBURG *et al.*, 1993), remover espécies reativas de oxigênio (ROS) (SMIRNOFF; CUMBES, 1989), é fonte de carbono e nitrogênio (HARE; CRESS, 1997), constituinte de proteínas da parede celular (NANJO *et al.*, 1999), componente da cascata de sinalização molecular do estresse (MAGGIO *et al.*, 2002) e a sua síntese e degradação levam à regulação do pH citoplasmático, promovendo equilíbrio redox na célula.

A principal via de síntese da prolina inicia-se com a conversão do glutamato a ácido glutâmico - γ - semialdeído (GSA) pela enzima Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase (P5CS). O GSA é convertido espontaneamente a Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato (P5C), que é finalmente reduzido à prolina pela P5C redutase (P5CR) (DELAUNEY; VERMA, 1993). A P5CS é limitante na biossíntese da prolina, cujo acúmulo inibe a atividade da enzima (ZHANG *et al.*, 1995). Estes mesmos autores observaram que a enzima mutante P5CSF129A de *Vigna aconitifolia* apresenta as mesmas características da P5CS, porém não é inibida pela prolina, promovendo maior acúmulo do aminoácido nos tecidos.

Esta e outras enzimas envolvidas no metabolismo de prolina vêm sendo utilizadas em estudos relacionados à tolerância a estresses abióticos como a seca e o estresse salino em diversas espécies vegetais (KAVI KISHOR *et al.*, 1995; ZHU *et al.*, 1998; HONG *et al.*, 2000; NANJO *et al.*, 1999; DE RONDE *et al.*, 2004; HMIDA-SAYARI *et al.*, 2005). Plantas de citrange 'Carrizo' transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* sob controle de promotor constitutivo 35S CaMV, acumularam cerca de cinco vezes mais prolina do que plantas não transformadas (MOLINARI *et al.*, 2004a). Os parâmetros fisiológicos quantificados nesse trabalho mostraram que o melhor aproveitamento da água por plantas transgênicas durante o déficit hídrico conferiu manutenção da abertura estomática

e de taxas fotossintéticas, dessa forma tais plantas sobreviveram a um período maior de restrição hídrica (MOLINARI *et al.*, 2004a).

O citrange ‘Carrizo’ é amplamente utilizado como modelo para transformação genética de plantas de citros, já que apresenta grande capacidade de regeneração *in vitro*. A sua utilização como porta-enxerto, entretanto, é bastante limitada devido a algumas características desfavoráveis que afetam seu desempenho em campo, tais como a susceptibilidade ao déficit hídrico, a solos salinos e a doenças como o exocorte e o declínio (STANNARD, 1973; O'BANNON; FORD, 1978; BERETTA *et al.*, 1994). Dessa forma, a utilização de plantas transgênicas de citrumelo ‘Swingle’ com alto acúmulo de prolina representa uma estratégia promissora para aumentar a tolerância ao déficit hídrico, além de proporcionar material importante tanto para estudos de tolerância ao estresse como para a utilização direta em sistemas produtivos.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas de citrumelo ‘Swingle’ superexpressando o gene mutante *P5CSF129A*, com alto acúmulo de prolina, por meio da análise de relações hídricas e de trocas gasosas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal e ensaio de tolerância ao déficit hídrico

As avaliações foram realizadas utilizando cinco cópias do evento de transformação CT-P5-20 de citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. Cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) obtido por Molinari (2003), e cinco cópias de planta controle não transformada. O evento CT-P5-20 foi selecionado para este estudo por ser o que possui a maior capacidade de acumular prolina livre nas folhas. As cópias foram obtidos via micropropagação *in vitro* de acordo com protocolo estabelecido por Molinari *et al.* (2004b). As plantas transgênicas contêm o gene mutante *P5CSF129A*, que codifica para a enzima-chave para a biossíntese de prolina Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase (P5CS), controlado por promotor constitutivo CaMV 35S (ZHANG *et al.*, 1995).

Plantas com quatro anos de idade foram dispostas em vasos contendo 15 Kg de substrato (3 terra: 1 areia: 1 composto orgânico), presentes em casa-de-vegetação do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), cujas instalações apresentam as características requeridas pelas normas da CTNBIO para estudos com organismos geneticamente modificados. Aproximadamente quatro semanas antes do início do experimento, as plantas foram podadas de forma a promover a maior uniformidade de massa da parte aérea.

A irrigação das plantas foi suspensa e o tempo de avaliação foi de 14 e 16 dias para plantas controle e transgênicas, respectivamente. O estado hídrico nas folhas foi monitorado através de psicrômetros de termopar (modelo C-30, Wescor, Inc., Logan, Ut, U.S.A.) acoplados a um datalogger (Campbell Scientific, Inc., Logan, Ut, U.S.A., modelo CR-7). A cada dia de leitura, entre 9h30min e 10h, discos foliares de aproximadamente 2 cm² de cada planta foram dispostos nos psicrômetros. O datalogger foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até que o equilíbrio da pressão de vapor na câmara fosse verificado. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio. Após a obtenção do potencial total da água (Ψ_t), os sensores foram imersos durante 4 min em nitrogênio líquido e as leituras retomadas para

obtenção do potencial osmótico (Ψ_s). O cálculo do potencial de pressão foi realizado através de $\Psi_t - \Psi_s$. Após terem atingido potencial total da água de aproximadamente -4,5 MPa, as plantas foram irrigadas novamente.

4.2.2 Fotossíntese líquida, transpiração, condutância estomática e eficiência do uso de água

As taxas de fotossíntese líquida foram obtidas utilizando um sistema portátil de fotossíntese, modelo LI-6200 (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), com câmara de 1 litro. As medidas feitas entre 9h30min e 10h em folhas em mesmo estágio de desenvolvimento do terço médio das plantas e foram expressas em $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Além das taxas de fotossíntese líquida (A), o sistema também forneceu valores de transpiração (E; $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). A partir desses valores também foi avaliada a eficiência do uso de água (EUA), que consiste na relação A/E.

A condutância estomática foi avaliada utilizando um porômetro, modelo LI-1600 (LI-COR, Lincoln, NE, EUA).

4.2.3 Fluxo de seiva

Medidas de fluxo de seiva xilemática foram realizadas utilizando sensores comerciais de balanço de calor (modelo SGB19; Dynamax Inc.) instalados na base do caule de quatro plantas controle e quatro plantas transgênicas. O sensor é formado por uma resistência elétrica de aquecimento (jaqueta térmica), pela qual é fornecida uma quantidade constante e conhecida de calor a uma seção do caule, e por um conjunto de termopares que medem a distribuição do calor nas diferentes direções.

Antes da instalação dos sensores, foi aplicada uma pasta com alta condutividade térmica (Dow Corning 4, Dow Corning Corporation) para otimizar o contato entre a fonte de calor e os termopares com o caule, conforme recomendação do fabricante. Depois da instalação, os sensores foram envolvidos com três camadas de papel-alumínio, a fim de reduzir o efeito da temperatura

devido à radiação incidente. A condutância térmica individual de cada sensor foi estimada durante as medidas noturnas, entre 4 e 5 h, período em que o fluxo foi considerado nulo. Adotou-se o valor de $0,42 \text{ W.m}^{-1}.\text{°C}^{-1}$ como condutividade térmica para o tronco de laranjeira, conforme Steinberg *et al.* (1989). Os sensores foram conectados a um sistema de aquisição de dados formado por um datalogger CR10X acoplado a um multiplexador AM 416 (Campbell Sci.), programado para realizar leituras a cada 30 s e armazenar a média dos dados a cada 15 min. A radiação fotossinteticamente ativa foi monitorada com um quantômetro acoplado ao sistema de aquisição de dados.

4.2.4 Quantificação do teor de prolina

A determinação do teor de prolina foi feita baseada em metodologia descrita por Bates (1973), com algumas modificações, em folhas de plantas controle e transgênicas nas seguintes condições de estresse: Sem estresse (SE; $\Psi_t = -1,3 \text{ MPa}$), estresse moderado (EM; $\Psi_t = -2,3 \text{ a } -2,5 \text{ MPa}$), estresse severo (ES; $\Psi_t = -3,8 \text{ a } -3,9 \text{ MPa}$) e recuperação (REC; 24 h após irrigação efetuada depois das plantas atingirem o nível severo de estresse; $\Psi_t = -1,3 \text{ a } -1,9 \text{ MPa}$).

Aproximadamente 30 mg de tecido foliar previamente macerados em N_2 líquido foram homogeneizados em 6 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v). Após centrifugação (7500 rpm) por 10 min, 2 mL do extrato foram coletados e adicionados a 2 mL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6 M) e 2 mL de ácido acético glacial, em tubos de microcentrífuga de 15 mL. As amostras foram incubadas a 100 °C por 1 h e em seguida colocadas em gelo para paralisar a reação. À solução foram adicionados 4 mL de tolueno, seguindo de agitação por 20 s para a completa extração da prolina. O sobrenadante foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro a 520 nm e as absorbâncias comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 100 µg. mL^{-1}). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expressos em micromol de prolina por grama de massa fresca (µmol. gMF^{-1}).

4.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, em parcelas subdivididas no tempo. As duas parcelas foram representadas pelas plantas controle e transgênicas e as quatro sub-parcelas referiram-se às condições de suprimento hídrico (sem estresse, estresse moderado, estresse severo e recuperação). Após análise de variância, as médias foram comparadas por teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS versão 6.4 (SAS, 1995).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Teor de prolina

O teor de prolina livre em folhas foi constante em todas as condições de suprimento hídrico em plantas transgênicas de citrumelo 'Swingle', apresentando valores 2,5 vezes maiores do que plantas controle nas condições sem estresse ($\Psi_t = -1,3$ MPa) e estresse moderado ($\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa). Somente durante o estresse hídrico severo ($\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa) houve acúmulo significativo de prolina em plantas controle, que atingiram os níveis obtidos em plantas transgênicas com o gene *P5CSF129A*.

Ainda em relação às plantas controle, foi observada a redução no conteúdo do aminoácido durante a recuperação em comparação ao tratamento estresse hídrico severo, mas com concentração ainda quase duas vezes superior ao obtido em condição normal de irrigação e sob estresse moderado (Figura 03).

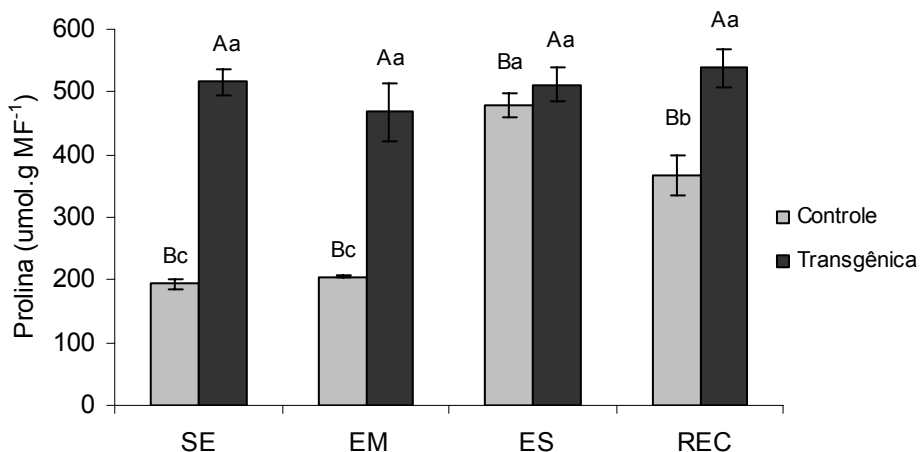


FIGURA 03 - Teor de prolina livre em folhas de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e de plantas controle não transformadas em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa) Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4.3.2 Relações hídricas na folha

Em condições normais de suprimento de água, plantas controle não transformadas e transgênicas apresentaram potencial hídrico total de -1,3 MPa (Figura 3A). Nove dias após a suspensão da irrigação houve queda no potencial hídrico total de ambas as plantas. Nesse dia, entretanto, as controle apresentaram menores valores ($\Psi_t = -2,5$ MPa), já também atingindo valores nulos de potencial de pressão, o que indica perda de turgor celular (Figura 5C). A partir desse dia, houve queda acentuada do potencial total em plantas controle, com o valor de -4,5 MPa no 14º dia de suspensão hídrica, ponto em que estas foram novamente irrigadas (Figura 5A).

Em relação às plantas transgênicas com alto acúmulo de prolina, a mesma queda no potencial total ocorreu a partir do 10º dia sem irrigação ($\Psi_t = -2,3$ MPa), entretanto, estas plantas tiveram potencial de pressão nulo somente no 12º dia (Figura 5A,C). As folhas destas plantas apresentaram potencial total de -4,5 MPa no 16º dia de restrição hídrica. Após 24 h do momento da re-irrigação, o potencial hídrico total de plantas controle e transgênicas foi restabelecido em valores de -1,9 e -1,3 MPa, respectivamente.

Plantas controle e transgênicas apresentaram praticamente o mesmo valor de potencial osmótico na condição irrigada ($\Psi_s = -1,5$ a -1,6 MPa) e nove dias após a suspensão da irrigação ($\Psi_s = -2,4$ a -2,5 MPa) (Figura 5B). A partir do 10º dia, porém, o potencial osmótico de plantas controle não transformadas continuou em queda, apresentando valores mínimos de cerca de -4,0 MPa, ponto a partir do qual estas foram re-irrigadas. Em plantas transgênicas, o potencial osmótico estabilizou do nono para o 10º dia de restrição hídrica, apresentando gradual diminuição do 13º ao 16º dia, quando atingiu valores mínimos de aproximadamente -4,0 MPa. Os potenciais osmóticos de plantas controle e transgênicas 24 h após a irrigação para recuperação das plantas foram de -2,2 e -1,6 MPa, respectivamente.

Enquanto as plantas controle apresentaram perda de turgescência aos nove dias após a suspensão da irrigação (potencial de pressão inferior a zero), esta condição, em plantas transformadas, foi atingida no 12º dia após o corte do fornecimento da água.

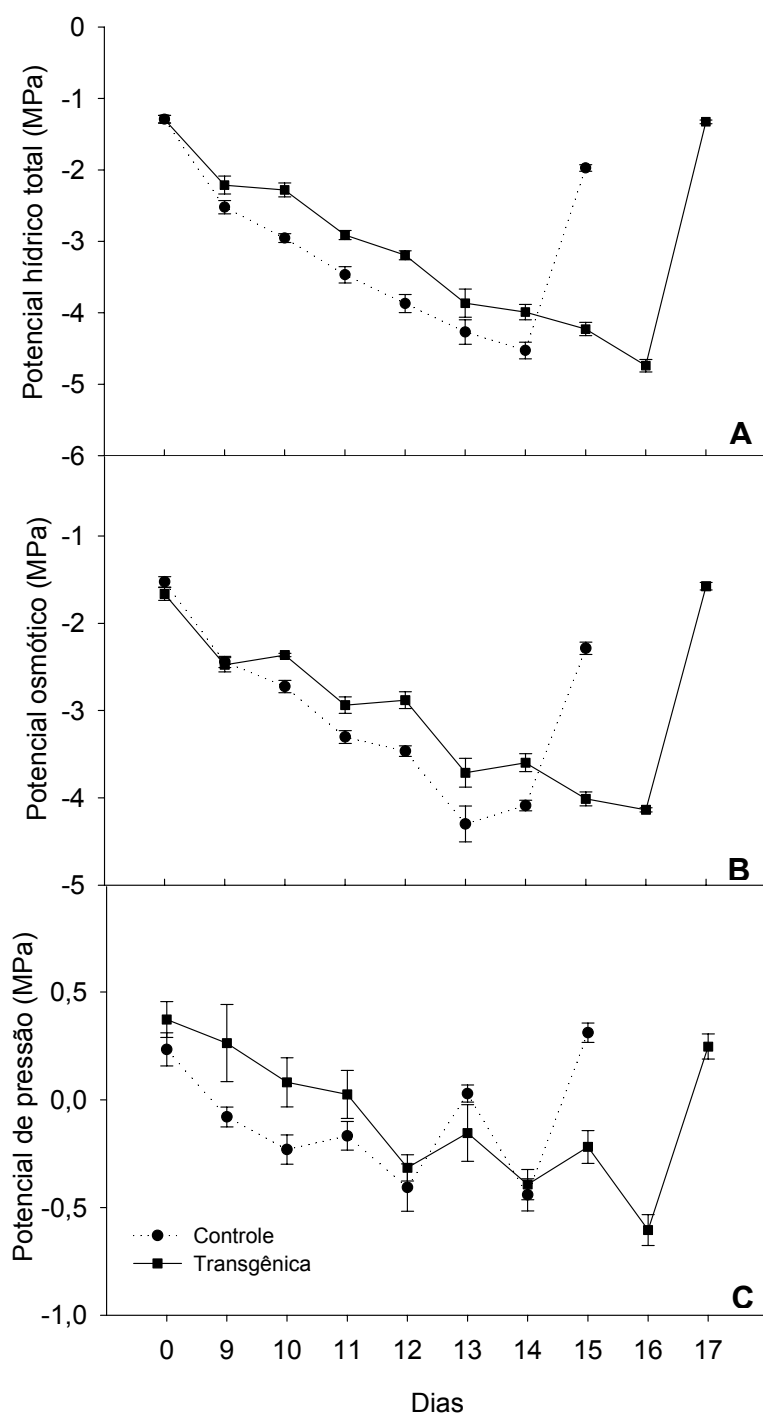


FIGURA 04 - A) Potencial hídrico total; B) Potencial osmótico; e C) Potencial de pressão em plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e plantas controle não transformadas, durante o período de restrição hídrica. Valores são apresentados por médias \pm erro padrão (n=4).

4.3.3 Fotossíntese líquida, transpiração, condutância estomática e eficiência do uso de água

A taxa fotossintética líquida obtida na condição irrigada foi similar em plantas controle não transformadas e em transgênicas com alto acúmulo de prolina, com valores de aproximadamente $13 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 6A). Nove dias após a suspensão da irrigação, em plantas transgênicas foram mantidos os valores iniciais, porém houve queda significativa nas taxas fotossintéticas de plantas controle não transformadas ($A=8,3 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), que continuaram a apresentar decréscimo da fotossíntese até o 12º dia. Nos dias subsequentes até o final do período de restrição de água, as taxas fotossintéticas em plantas controle foram mantidas constantes, com cerca de $1,5 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sendo que dois dias após a re-irrigação a fotossíntese foi restabelecida, com valores de aproximadamente $11 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As plantas transgênicas também apresentaram queda expressiva da fotossíntese a partir do décimo dia, com valores de $8,5 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Houve estabilização das taxas fotossintéticas no 13º dia, com $2,5 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após a re-irrigação, que ocorreu no 16º dia, as plantas transgênicas apresentaram valores de fotossíntese líquida observados em condições normais de suprimento de água.

Nas condições iniciais, as taxas de transpiração foram praticamente as mesmas em plantas controle e transgênicas, com valores em torno de $6,5 \text{ mmol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 6B). Logo no nono dia de restrição hídrica, houve queda expressiva na transpiração de plantas controle não transformadas, o que ocorreu em plantas transgênicas somente no 11º dia após a suspensão da irrigação. Em ambas as plantas, as taxas de transpiração se estabilizaram no 13º dia, com valores mínimos de aproximadamente $2,0 \text{ mmol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após a re-irrigação, a transpiração foi restabelecida em valores similares aos obtidos na condição normal de suprimento de água.

Os valores de eficiência do uso de água (EUA) relacionam as taxas fotossintéticas e transpiratórias, e conferem um indicativo da quantidade de carbono fixado durante a fotossíntese por unidade de água transpirada. O valor inicial para este parâmetro foi ligeiramente maior em plantas controle do que em transgênicas, com 2,1 e $1,8 \mu\text{mol CO}_2.\text{mmol H}_2\text{O}^{-1}$, respectivamente (Figura 6C).

No décimo dia após a suspensão da irrigação, entretanto, a EUA de plantas controle apresentou queda acentuada, atingindo aproximadamente $0,8 \mu\text{mol CO}_2.\text{mmol H}_2\text{O}^{-1}$, valor obtido em plantas transgênicas no 12º dia sem suprimento de água. Diferentemente de plantas controle, que mantiveram a EUA praticamente constante até o final do período de restrição hídrica, plantas transgênicas apresentaram leve aumento dos valores de EUA nesse período. Após a re-irrigação, a EUA em ambas as plantas foi de cerca de $1,5 \mu\text{mol CO}_2.\text{mmol H}_2\text{O}^{-1}$.

Assim como a fotossíntese e a transpiração, a condutância estomática na condição irrigada foi similar entre plantas controle e transgênicas, apresentando valores médios de $0,16 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 7). No nono dia após a suspensão da irrigação, houve queda acentuada da condutância estomática nas plantas controle ($g_s=0,02 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), que apresentaram valores mínimos de aproximadamente $0,01 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nos dias subsequentes até o final do período de restrição hídrica. Após a re-irrigação, a condutância estomática em folhas dessas plantas foi de $0,12 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A queda na condutância estomática em folhas de plantas transgênicas foi observada somente a partir do décimo dia de restrição hídrica, apresentando nesse ponto valor de $0,05 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nestas plantas houve decréscimo na condutância estomática até o 12º dia, a partir do qual esta se estabilizou, apresentando valores mínimos superiores aos das plantas controle nas mesmas condições. Após a re-irrigação, plantas transgênicas apresentaram valores de condutância estomática de aproximadamente $0,10 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

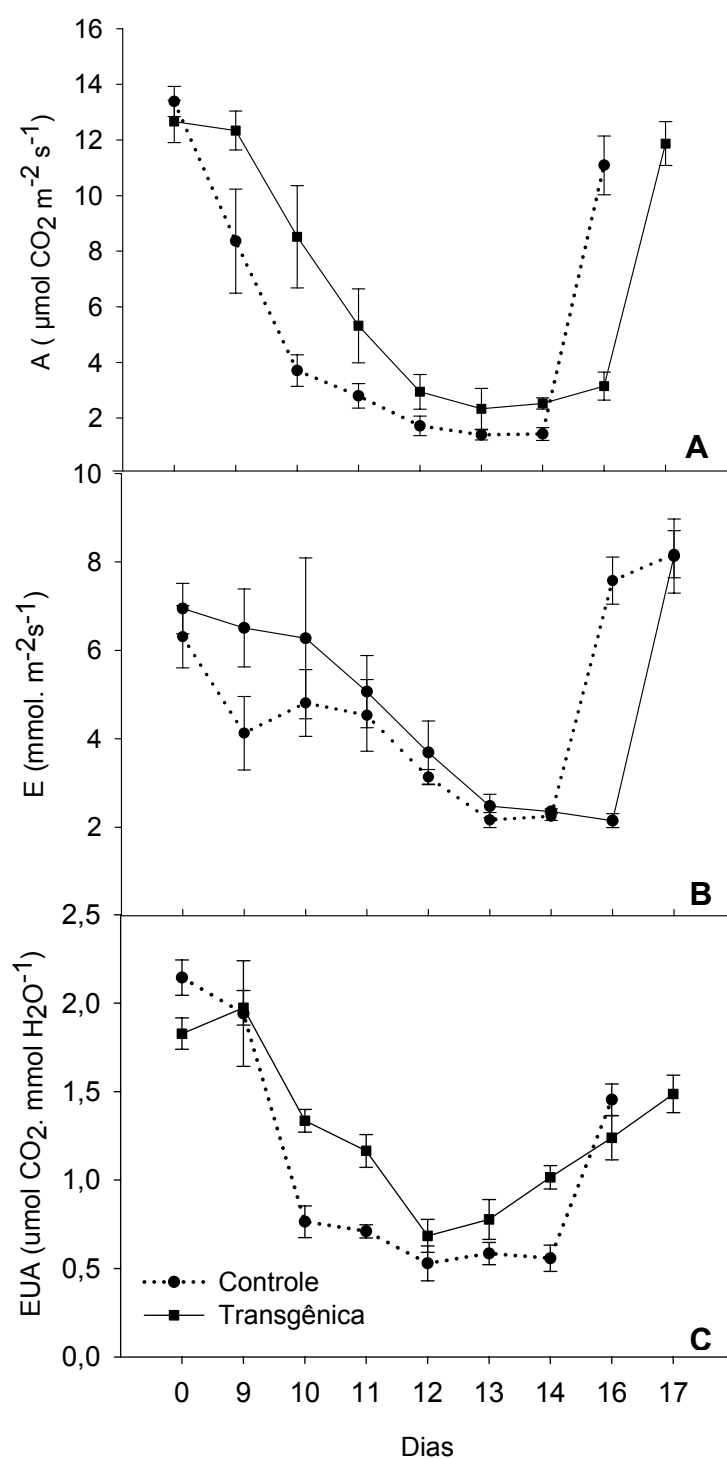


FIGURA 05 - A) Fotossíntese líquida; B) Transpiração; e C) Eficiência do uso de água (EUA) em plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e plantas controle não transformadas, durante o período de déficit hídrico. Valores são apresentados por médias \pm erro padrão (n=4).

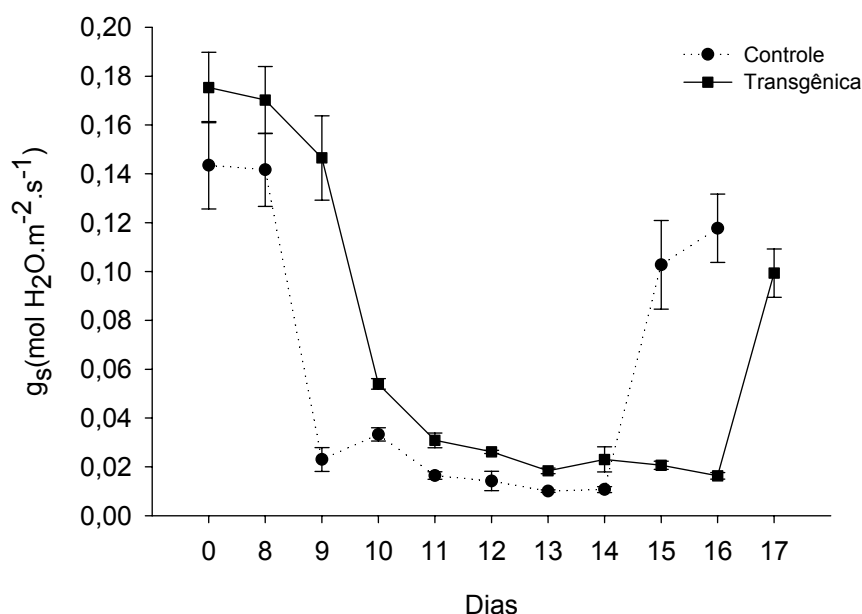


FIGURA 06 - Condutância estomática em plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e plantas controle não transformadas, durante o período de restrição hídrica. Valores são apresentados por médias \pm erro padrão (n=4).

4.3.4 Fluxo de seiva

Os valores apresentados na figura 07 referem-se ao fluxo diário de água pelo xilema das plantas durante o período de restrição hídrica. No início do experimento, o fluxo de seiva em plantas controle e transgênicas foi similar. O mesmo padrão foi observado até o sétimo dia sem irrigação. No oitavo dia, mesmo com alta demanda evaporativa indicada pela elevada incidência de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), plantas controle tiveram redução no fluxo de seiva, o que não ocorreu em plantas transgênicas. No nono dia após a suspensão da irrigação, houve queda no fluxo em ambas as plantas, sendo que as controle não transformadas apresentaram nesse dia metade do fluxo observado em plantas transgênicas.

Após 10 dias de restrição de água, o fluxo de seiva no xilema nas plantas controle manteve-se relativamente estabilizado em valores baixos até o final do período de restrição de água, sendo que um dia após a reidratação destas plantas o fluxo aumentou. Em plantas transgênicas, o fluxo de seiva manteve-se baixo a partir do 11º dia sem irrigação até o final do período de estresse. Após a irrigação,

o fluxo nestas plantas aumentou mesmo levando-se em consideração a baixa RFA observada nesse dia.

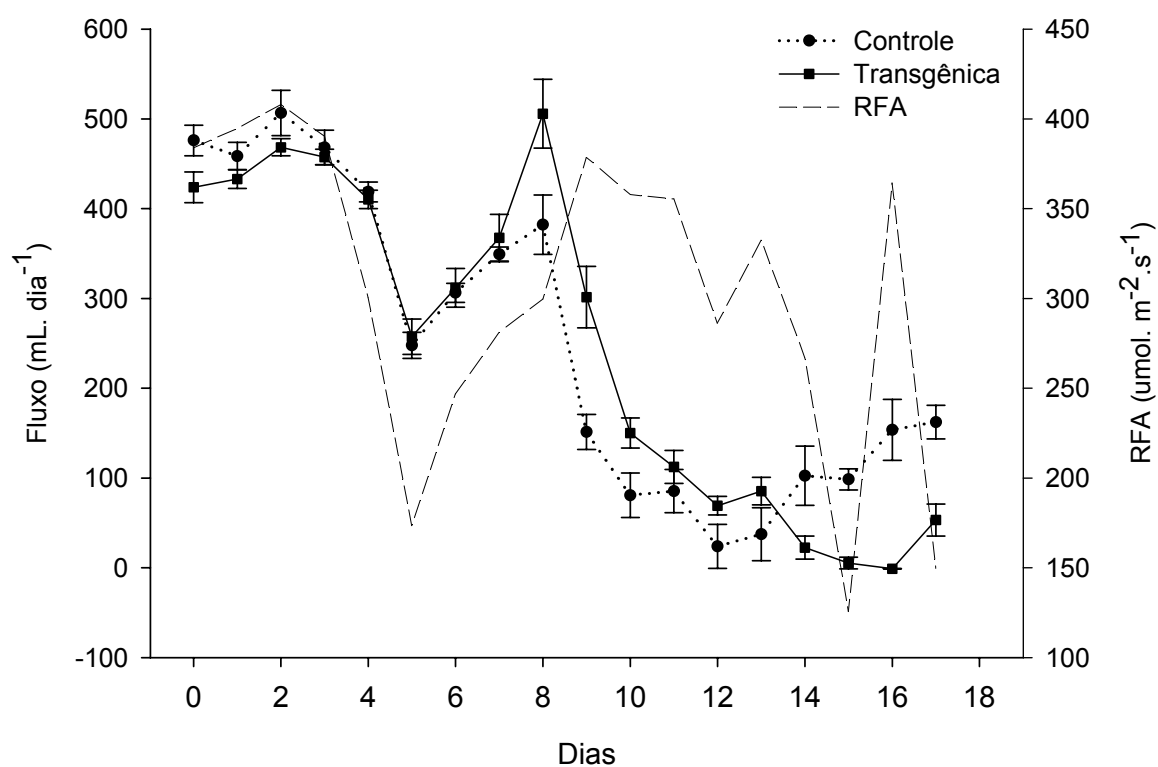


FIGURA 07 - Fluxo de seiva xilemática em plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* e em plantas controle não transformadas, durante o período de restrição hídrica. Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). RFA: Radiação fotossinteticamente ativa.

4.4 DISCUSSÃO

O acúmulo de prolina em plantas representa uma importante resposta adaptativa a estresses abióticos, principalmente devido à sua propriedade osmoprotetora. Durante situações de seca e alta salinidade, o seu acúmulo reduz a osmolaridade da célula, promovendo o influxo de água, que por sua vez promove a manutenção do turgor necessário para a expansão celular e aumento da rigidez mecânica de células e tecidos (KAVI KISHOR *et al.*, 2005). Diversos trabalhos associam o acúmulo de níveis elevados de prolina e a tolerância a estresses osmóticos, como seca e salinidade (HONG *et al.*, 2000).

De fato, plantas transgênicas de citrumelo ‘Swingle’ contendo elevados teores de prolina apresentaram maior tolerância ao déficit hídrico do que plantas controle não transformadas. Isso pode ser demonstrado por valores positivos do potencial de pressão obtidos em folhas de plantas transgênicas até o 12º dia após a suspensão da irrigação (Figura 4C). A presença de altos níveis de prolina nessas plantas provavelmente contribuiu para a ocorrência de ajustamento osmótico, o que não foi observado em plantas controle. Nestas, houve redução passiva do potencial osmótico (Figura 4B), resultante da perda de água das células, cujos potenciais de pressão anularam-se logo no nono dia de restrição hídrica. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Molinari *et al.* (2004a), que constataram a presença de ajustamento osmótico durante o déficit hídrico em plantas transgênicas de citrange ‘Carrizo’ com elevado acúmulo de prolina.

O principal fator que leva à queda de taxas fotossintéticas durante o déficit hídrico é a reduzida difusão do CO₂ atmosférico ao sítio de carboxilação (FLEXAS *et al.*, 2006), em parte devido ao fechamento dos estômatos. A condutância estomática em plantas transgênicas se manteve superior à observada em plantas controle, principalmente nos 10 primeiros dias após a suspensão da irrigação (Figura 6). Os valores obtidos são indicativos de uma maior manutenção da abertura dos estômatos, o que por sua vez possibilitou melhor desempenho fotossintético em plantas transgênicas.

Alguns trabalhos contestam o papel benéfico da prolina relacionada à fotossíntese. Sivakumar *et al.* (1998) demonstraram que a aplicação exógena de

100 mM de prolina suprimiu a atividade da Rubisco em plântulas de mostarda, *Sesbania sesban* e arroz, e essa atividade foi reduzida em até 50% quando em presença de 1 M prolina. A enzima foi sensível ao estresse por NaCl e a prolina parece ter acelerado a inatividade da Rubisco nessa situação. Além deste, outros trabalhos sugerem que a presença do aminoácido em concentrações milimolares tem efeitos tóxicos para membranas de cloroplastos e mitocôndrias como, por exemplo, em *arabidopsis* (HARE *et al.*, 2001). Por outro lado, a aplicação de 200 mM de prolina em plantas de *Tamarix jordanis* sob estresse salino aliviou a inibição da atividade da Rubisco (SOLOMON *et al.*, 1994). Além disso, plantas transgênicas de tabaco com alto acúmulo de prolina não mostraram danos em estruturas subcelulares como cloroplastos e mitocôndrias através de microscopia eletrônica de varredura (BORGIO, 2004).

Estes resultados divergem primariamente devido à forma de utilização do aminoácido (manipulação exógena ou endógena), à variação da concentração de prolina aplicada e principalmente devido às espécies vegetais utilizadas, uma vez que cada uma apresenta um determinado potencial de acúmulo e degradação da prolina, sem que haja custos metabólicos para a planta. Folhas de tabaco, por exemplo, acumulam naturalmente cerca de 4 $\mu\text{M} \cdot \text{gMF}^{-1}$ (HONG *et al.*, 2000), enquanto que em folhas de citros em condições irrigadas foram detectados até mais de 200 $\mu\text{M} \cdot \text{gMF}^{-1}$ (MOLINARI *et al.*, 2004).

Apesar de não terem sido realizadas análises da ultra-estrutura de organelas e a determinação da atividade da Rubisco, neste estudo provavelmente não houve repressão da atividade da Rubisco nem danos em cloroplastos pela prolina presente nos tecidos de plantas transgênicas, já que estas apresentaram maiores taxas fotossintéticas observadas em relação às controle não transformadas durante a restrição hídrica (Figura 5A).

Assim como a fotossíntese, a transpiração também foi afetada pela condutância estomática. Plantas transgênicas apresentaram queda nas taxas transpiratórias no 11º dia após a suspensão da irrigação, enquanto que em plantas controle não transformadas isso foi observado já no nono dia (Figura 5B). A amplitude da diferença entre as taxas transpiratórias de plantas controle e transgênicas, porém, foi menor do que a observada em relação às taxas fotossintéticas, e os resultados de eficiência do uso da água (EUA) demonstram

esta variação. Menores valores da EUA de plantas controle a partir do nono dia de restrição hídrica indicaram que houve menor assimilação de CO₂ por unidade de H₂O transpirada do que em plantas transgênicas, mesmo em condições similares de transpiração observadas a partir do 11º dia (Figura 5C). Isto pode ser consequência de limitações impostas pela deficiência hídrica na atividade metabólica da fotossíntese em plantas controle. Por outro lado, a manutenção da EUA em plantas transgênicas provavelmente ocorreu devido à presença da prolina em folhas destas plantas, o que favoreceu a assimilação de CO₂ com melhor aproveitamento da água.

Além de contribuir para o ajustamento osmótico, os elevados teores de prolina presentes em plantas transgênicas de citrumelo 'Swingle' podem ter desempenhado um papel adicional de proteção das plantas durante o déficit hídrico. A biossíntese de prolina a partir do glutamato envolve a utilização de poder redutor (NADPH) e energia química (ATP) que não são consumidos devido à redução da disponibilidade de CO₂ intracelular em folhas estressadas (HARE; CRESS, 1997). Ainda, a prolina pode ter contribuído para a estabilização de proteínas (VANRENSBURG *et al.*, 1993), como enzimas envolvidas nas reações fotossintéticas, além de remover radicais livres que prejudicam o transporte de elétrons (SMIRNOFF; CUMBES, 1989).

4.5 CONCLUSÕES

A presença de elevados níveis endógenos de prolina confere maior tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas de citrumelo 'Swingle' do que em plantas não transformadas, devido à contribuição do aminoácido para a ocorrência de ajustamento osmótico e consequente manutenção da turgescência das folhas. Esta manutenção de turgor em plantas transgênicas ainda influencia a condutância estomática, resultando em melhor desempenho fotossintético e de eficiência do uso da água nestas plantas do que em plantas controle não transformadas.

4.6 REFERÊNCIAS

BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BERETTA, M. J. G.; POMPEU JÚNIOR, J.; DERRICK, K. S.; LEE, R. F.; HEWITT, B.; BARTHE, G. Evaluation of roostocks in Brasil for field resistance to declínio. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., Acireale, 1992. **Proceedings**. Acireale: International Society of Citriculture, 1994. p. 841-843.

BERGUER, R. D. A causa e o controle do declínio dos citros. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 1, p. 79-90, 1998.

BORGO, L. **Estudos fisiológicos e moleculares em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) para tolerância ao déficit hídrico**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRÜGER, G. H.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1211-1224, 2004.

DOORENBOS, J.; KASSAM, A. H. **Efeito da água no rendimento das culturas**. Tradução: GHEYI, H. R. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 1994. 306 p. (Estudos da FAO, Irrigação e Drenagem, 33).

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em 25/04/06.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBÓ, M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 343–352, 2006

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. Araraquara, 2003. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/>>. Acesso em: 17/04/03.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, vol 21, p. 79-102, 1997.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in Arabidopsis leaves. **South African Journal of Botany**, v. 68, p. 393–396, 2002.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDANI, A.; JAOUA, L.; SAVOURÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 196, p. 746-752, 2005.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, n. 122, p. 1129-1136, 2000.

KAVI KISHOR, P. B.; HONG, Z.; MIAO, G. H.; HU, C. A. A.; VERMA, D. P. S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387-1394, 1995.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and

transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; RIBEIRO, R. V.; MEDINA, C. L.; STUCHI, E. S.; PAVANI, L. C. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranjeira 'Natal'. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 373-379, 2007.

MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J. I.; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M. L.; HASEGAWA, P. M.; JOLY, R. J.; BRESSAN, R. A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **The Plant Journal**, v. 31, p. 699–712, 2002.

MEDINA, C. L. **Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranjeira 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002, 147 p.

MOLINARI, H. B. C. **Transformação genética de porta-enxertos para *Citrus* spp. visando obter maior tolerância ao estresse hídrico**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

MOLINARI, H. B. C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, v. 99, p. 379-385, 2004b.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; LEITE JÚNIOR, R. P.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Obs.x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, p. 1375-1381, 2004a.

NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, n. 18, v. 2, p. 185-193, 1999.

NEVES, M. F.; JANK, M. S. (Org.) Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: A agenda 2015. **PENSA/USP/ICONE**, São Paulo, 2006.

O'BANNON, J. H.; FORD, H. W. Resistance in citrus rootstocks to *Radopholus similis* and *Tylenchulus semipenetrans* (Nematoda). **Proceeding International Society of Citriculture**, 2, p. 544-594, 1978.

ORTOLANI, A.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; ALFONSI, R. R. Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. A. (Eds.) **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 153-195.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.) **Citros**. Campinas: 2005. Cap. 4.

SAS Institute Inc. The SAS system for windows, release 6.4. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., Cary, 1995.

SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.) **Citros**. Campinas: 2005. Cap. 11.

SIVAKUMAR, P.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. P. Proline suppresses Rubisco activity in higher plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 252, p. 428-432, 1998.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

SOLOMON, A.; BEER, S.; WAISEL, Y.; JONES, G. P.; PALEG, L. G. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. **Physiologia Plantarum**, v. 90, n. 1, p. 198-204, 1994.

STANNARD, M. C. Citrus rootstocks in Australia. In: WORLD CONGRESS OF CITRICULTURE, 1., 1973, Valencia. **Proceedings...** Valencia: Int. Soc. Citriculture, 1975. v. 2, p. 191-193.

STEINBERG, S.; VAN BAVEL, C. H. M.; Mc FARLAND, M. J. A gauge to measure mass flow rate sap in steams and trunks of wood plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 114, n. 3, p. 466-472, 1989.

TOPP, G. C.; DAVIS, J. L.; ANNAN, A. P. Electromagnetic determination of soil water content: measurements in coaxial transmission lines. **Water Resources Research**, v. 16, p. 574-582, 1980.

VAN RENSBURG, L.; KRÜGER, G. H. J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 188-194, 1993.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523-539, 2006.

ZHANG, C. S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, n. 270, p. 20491-20496, 1995.

ZHANG, J.; NGUYEN, H. T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal of Experimental Botany**, n. 50, p. 291-302, 1999.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M.; VERMA, D. P. S.; FAN, Y. L.; WU, R. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science**, v. 139, p. 41-48, 1998.

5 ARTIGO

Atividade de enzimas antioxidantes em plantas de citrumelo 'Swingle' transgênicas com alto acúmulo de prolina em resposta ao déficit hídrico

RESUMO

O déficit hídrico é um dos principais fatores abióticos que afetam o desempenho de diversas espécies cultivadas em todo o mundo. Em plantas, o déficit hídrico induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como íons superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil, que prejudicam o metabolismo celular através da oxidação de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos. Sistemas antioxidantes são conhecidos por atenuar os efeitos do estresse oxidativo, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), assim como antioxidantes não enzimáticos. Em resposta a estresses abióticos, plantas acumulam osmoprotetores, como o aminoácido prolina, que desempenha um papel importante no ajustamento osmótico e remoção de radicais livres. Neste trabalho foi avaliado o efeito da prolina na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX em plantas transgênicas do porta-enxerto para citros citrumelo 'Swingle' contendo o gene mutante *P5CSF129A*, que codifica para a enzima-chave da biossíntese de prolina, submetidas ao déficit hídrico. Plantas controle não transformadas e plantas transgênicas foram submetidas a um período de 14 e 16 dias sem irrigação, respectivamente. Os pontos de coleta foram determinados a partir de medidas de potencial total de água, que representaram os seguintes níveis de estresse: Sem estresse (SE; $\Psi_t = -1,3$ MPa), estresse moderado (EM; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), estresse severo (ES; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa) e recuperação (REC; 24 h após re-irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Folhas foram submetidas às quantificações de prolina, malondialdeído (MDA), antioxidantes totais e das atividades das enzimas CAT, SOD e APX. Plantas transgênicas apresentaram valores 2,5 vezes maiores de prolina do que em plantas controle nas condições sem estresse e estresse moderado, sendo que plantas controle atingiram níveis similares somente no estresse severo. Os níveis de MDA foram significativamente maiores em plantas controle do que em transgênicas nas condições de estresse moderado e severo. O conteúdo de antioxidantes totais aumentou com o estresse severo, porém não houve diferença entre plantas controle e transgênicas. O mesmo comportamento foi observado nas atividades da SOD e APX, que apresentaram redução durante o déficit hídrico em maior proporção em plantas controle, seguida de elevação 24 h após a reidratação. A CAT foi mais ativa em plantas controle do que em transgênicas em todos os pontos de coleta. A atividade desta enzima aumentou significativamente durante o período de estresse, tendo redução durante a recuperação. Estes resultados sugerem que a prolina desempenha um importante papel no combate ao estresse oxidativo por atuar diretamente na proteção contra a peroxidação lipídica induzida pelo déficit hídrico. Além disso, ela influencia a atividade de enzimas antioxidantes, provavelmente devido ao seu papel estabilizador de proteínas e removedor de radicais livres.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; remoção de ROS; P5CS; tolerância à seca.

Antioxidant enzymatic activity in transgenic ‘Swingle’ citrumelo overaccumulating proline under drought stress

ABSTRACT

Water deficit is one of the major abiotic factors affecting agriculture in different areas in the world. In plants, drought stress leads to the accumulation of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals, which initiate destructive oxidative processes in lipid membranes, proteins and nucleic acids. In order to cope with oxidative stress, plants developed antioxidant defenses, including enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and non-enzymatic compounds. Water deficit also induces the production and accumulation of osmolytes, such as proline, which plays an important role in osmotic adjustment and ROS scavenging. This study investigated proline effect in SOD, APX and CAT activities in leaves of ‘Swingle’ citrumelo rootstocks transformed with the *P5CSF129A* gene, coding for the key-enzyme for proline synthesis, under drought stress. Non-transformed control and transgenic plants were submitted to a 14 and 16-day period without irrigation, respectively. Leaves were collected based on their total water potential, representing the following stress levels: Irrigated (SE; $\Psi_t = -1.3$ MPa), moderate stress (EM; $\Psi_t = -2.3$ to -2.5 MPa), severe stress (ES; $\Psi_t = -3.8$ to -3.9 MPa) and recovery (REC; 24 h after rehydration; $\Psi_t = -1.3$ to -1.9 MPa). Proline, MDA and total antioxidant contents were quantified in leaves, and CAT, SOD and APX activities were also evaluated. Transgenic plants accumulated 2.5-fold higher proline content than non-transformed control plants in the SE and EM conditions. During the ES, control plants presented similar proline levels observed in transgenic leaves. MDA content was significantly higher in control plants during water deficit, in comparison to transgenic plants. Total antioxidant increased in ES condition, but no difference was observed between control and transgenic plants. Both APX and SOD activities decreased during moderate and severe stress, in higher amount in control plants, with a following increase 24 h after rehydration. CAT was more active in control than in transgenic plants in all stress levels; CAT activity increased significantly during the stress period, decreasing after recovery. These results suggest that proline plays an important role during oxidative stress by acting directly in water deficit induced lipid peroxidation. Besides, proline influences antioxidant enzyme activities, probably either by its protein stabilization or ROS scavenging functions.

Key-words: Oxidative stress; ROS scavenger; P5CS; drought tolerance.

5.1 INTRODUÇÃO

Os citros são as frutas mais cultivadas mundialmente, sendo produzidas em mais de 140 países (FAO, 2004). O setor citrícola brasileiro apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país (NEVES; JANK, 2006). Os porta-enxertos influenciam diretamente diversos aspectos fisiológicos e de desenvolvimento da copa, assim como conferem tolerância a pragas, doenças e estresses ambientais (POMPEU JUNIOR, 2005). A utilização em larga escala de limão 'Cravo', presente em 80% dos pomares, representa uma vulnerabilidade da citricultura brasileira devido aos potenciais riscos causados por mudanças climáticas ou pelo surgimento de novas doenças, como foi o caso da Morte Súbita dos Citros (MSC), o que torna necessário o processo de diversificação de germoplasma. Dentre os principais porta-enxertos alternativos ao limão 'Cravo', o citrumelo 'Swingle' apresenta vantagens como a tolerância à MSC, porém é sensível à seca (FUNDECITRUS, 2003).

Apesar das regiões citrícolas brasileiras apresentarem boa distribuição de chuvas (DOORENBOS; KASSAM, 1994), períodos de déficit hídrico são frequentes e prejudicam a cultura em diferentes aspectos (ORTOLANI, *et al.*, 1991). O fechamento dos estômatos em plantas estressadas leva à diminuição nas taxas fotossintéticas e de crescimento. A abscisão de folhas, frutos e flores (SENTELHAS, 2005), além do agravamento de danos causados por doenças como o declínio (BERGUER, 1998) e a CVC (MEDINA, 2002; MACHADO *et al.*, 2007), também são fatores que afetam a produtividade durante a seca.

Em plantas, a resposta ao estresse inicia-se a partir da percepção do baixo potencial hídrico nas membranas celulares, que desencadeia uma série de eventos envolvidos na ativação de genes e síntese de compostos que induzem uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas. Durante o estresse, ocorre diminuição da condutância estomática e aumento no comprimento das raízes, de forma a melhorar o desempenho das espécies cultivadas. Porém, há menor captação de CO₂ devido ao fechamento dos estômatos, e a energia requerida para o crescimento de raízes é desviada de tecidos fotossintéticos e reprodutivos. Em casos de deficiência hídrica severa, os mecanismos citados não oferecem

mais proteção contra os efeitos do baixo potencial hídrico (VERSLUES *et al.*, 2006). Como forma de tolerância, as plantas devem evitar a dessecação celular, promovendo o influxo de água, através do acúmulo de solutos na célula, que reduz o potencial osmótico, em processo denominado ajustamento osmótico (ZHANG *et al.*, 1999).

Danos causados pelo déficit hídrico induzem o estresse oxidativo, resultado da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^-) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Essas ROS afetam o metabolismo de plantas através da oxidação de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos, além de inibir processos fisiológicos como fotossíntese e respiração, podendo acarretar em morte celular (SCANDALIOS, 2005).

Para minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo, as plantas desenvolveram múltiplas linhas de defesa que incluem sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. A enzima superóxido dismutase (SOD), por exemplo, catalisa O_2^- em H_2O_2 e O_2 , e as enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) apresentam função de remover H_2O_2 (PERL-TREVES; PERL, 2002). Entretanto, o funcionamento desses sistemas pode ser interrompido em condições de estresse, como o déficit hídrico, induzindo maior acúmulo de ROS. Essa situação requer mecanismos que amenizem o processo autocatalítico sofrido pelas plantas (SCANDALIOS, 2005).

Durante estresses abióticos, ocorre acúmulo do aminoácido prolina, adicionalmente à ativação da atividade de enzimas antioxidantes. Dentre os diversos papéis que a prolina exerce na célula, incluindo a mediação do ajustamento osmótico e estabilização de proteínas (VAN RENSBURG *et al.*, 1993), ela promove a proteção contra o estresse oxidativo por remover radicais livres com eficiência e por ativar enzimas antioxidantes (SMIRNOFF; CUMBES, 1989). A principal via de síntese da prolina durante o estresse ocorre com a conversão do glutamato a ácido glutâmico - γ - semialdeído (GSA) pela enzima Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase (P5CS). O GSA é convertido espontaneamente a Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato (P5C), que é reduzido à prolina pela P5C redutase (P5CR) (DELAUNEY; VERMA, 1993). A P5CS é limitante na biossíntese da prolina, cujo acúmulo inibe a atividade da enzima (ZHANG *et al.*,

1995). Estes mesmos autores observaram que a enzima mutante P5CSF129A de *Vigna aconitifolia* apresenta as mesmas características da P5CS, porém não é inibida pela prolina, promovendo maior acúmulo do aminoácido nos tecidos.

Esta e outras enzimas envolvidas no metabolismo de prolina vêm sendo utilizadas em estudos de tolerância a diferentes estresses, como seca e salinidade (KAVI KISHOR *et al.*, 1995; ZHU *et al.*, 1998; HONG *et al.*, 2000; NANJO *et al.*, 1999; DE RONDE *et al.*, 2004; HMIDA-SAYARI *et al.*, 2005). Além disso, nos últimos anos tem-se dado mais enfoque ao papel que a prolina exerce na proteção contra o estresse oxidativo em diversos organismos (CHEN; DICKMAN, 2005; JACQUET, 2002; TRIPATHI E GAUR 2004). Em plantas, a manipulação de níveis endógenos e exógenos de prolina tem sido amplamente explorada, resultando em dados importantes, porém, bastante variados, principalmente ao avaliar o efeito da prolina nas atividades das enzimas antioxidantes (KOCSY *et al.*, 2005; HOQUE *et al.*, 2007a; HOQUE *et al.*, 2007b; OZDEN *et al.*, 2009).

A aplicação exógena de prolina aliviou os sintomas do estresse oxidativo induzido por salinidade em células de tabaco (HOQUE *et al.*, 2007a; 2007b; 2008) devido à ativação de enzimas antioxidantes, como as do ciclo glutatona-ascorbato (APX, monodeidroascorbato redutase - MDHAR e glutatona redutase - GR) (HOQUE *et al.*, 2007b), CAT e peroxidase (HOQUE *et al.*, 2007a). O emprego de prolina exógena também proporcionou um efeito positivo no sistema antioxidante enzimático em folhas de videira, particularmente na ativação de APX e peroxidase em resposta ao estresse oxidativo ocasionado pelo H₂O₂ (OZDEN *et al.*, 2009).

O maior acúmulo de prolina obtido em plantas de soja transgênicas com o gene *P5CR* na direção senso (S) conferiu menor porcentagem de danos e maior conteúdo relativo de água do que plantas controle e antisense (AS), após um período de estresse térmico e déficit hídrico associado (KOCSY *et al.*, 2005). Ao avaliar aspectos dos sistemas antioxidantes, foi observado nesse trabalho que não houve diferença na atividade de SOD entre as plantas e que as atividades de APX e GR foram significativamente maiores nos transformantes AS. O maior nível de ascorbato, associado à prolina acumulada nas plantas S parece ter sido

suficiente para a redução efetiva das ROS, não havendo participação das enzimas antioxidantes nesse caso.

Molinari *et al.* (2007) observaram que o aumento da prolina presente em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico atuou mais como um agente antioxidante do que como um osmoprotetor. Não houve ajustamento osmótico nessas plantas em solos secos, porém elas apresentaram melhor eficiência fotoquímica do PSII e maior conteúdo de clorofila do que plantas controle não transformadas, dados que sustentam a hipótese de que a prolina opera na proteção do aparato fotossintético através da remoção de radicais livres.

Por outro lado, plantas de citrange 'Carrizo' transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* acumularam cerca de cinco vezes mais prolina do que plantas não transformadas (MOLINARI *et al.*, 2004), e por isso apresentaram ajustamento osmótico durante déficit hídrico, apresentando-se mais tolerantes do que as plantas controle. Porém, nesse caso não foi avaliado o papel adicional da prolina na proteção contra o estresse oxidativo.

O conhecimento do papel da prolina na remoção de ROS e ativação de enzimas antioxidantes é baseado em estudos que utilizam altas aplicações exógenas desse aminoácido. Poucos trabalhos abordam essas funções da prolina em sistemas vegetais com elevada produção endógena (KOCSY *et al.*, 2005; MOLINARI *et al.*, 2007). Além disso, as espécies utilizadas nestes trabalhos caracterizam-se por naturalmente acumularem baixas concentrações de prolina, em comparação às plantas de citros (NOLTE; HANSON, 1997).

O objetivo desse trabalho, portanto, foi avaliar as alterações na atividade de enzimas antioxidantes em um modelo vegetal reconhecido por acumular alto conteúdo de prolina. Para isso, foram utilizadas plantas transgênicas de citrumelo 'Swingle', porta-enxerto de citros que apresenta altos níveis de prolina nas folhas, contendo o transgene *P5CSF129A* sob controle do promotor 35S CaMV. Nestas plantas foram analisadas as atividades das enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase, tanto em condições normais de suprimento de água, como em resposta ao déficit hídrico.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Coleta e acondicionamento do material vegetal

Os pontos de coleta do material foliar para análises bioquímicas foram determinados pelas medidas de parâmetros hídricos, como potencial hídrico total e conteúdo de água no substrato, obtidos no ensaio de tolerância ao estresse (p. 59). Cerca de cinco folhas em mesmo estágio de desenvolvimento de cada clone de planta controle e do evento transgênico foram coletadas, imediatamente imersas em N₂ líquido e transferidas para freezer a -80 °C. A escolha dos pontos a serem avaliados baseou-se nos valores de potencial total de água. As análises foram realizadas em folhas de plantas controle e transgênicas quando estas apresentaram potenciais hídricos similares, o que ocorreu em dias distintos após o início do estresse. Dessa forma, foi possível analisar respostas das plantas em condições de turgor semelhantes, permitindo a avaliação de todos os parâmetros em nível celular.

Os tratamentos foram denominados 'sem estresse' (SE), 'estresse moderado' (EM), 'estresse severo' (ES) e 'recuperação' (REC) e referem-se às condições normais de suprimento de água ($\Psi_t = -1,3$ MPa), estresse moderado ($\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), estresse severo ($\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa) e 24 h após a irrigação efetuada depois das plantas atingirem o nível severo de estresse ($\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa), respectivamente. As repetições biológicas foram representadas por quatro pools de folhas das plantas controle e quatro pools de folhas das plantas do evento transgênico. Cada pool consistiu em uma folha de cada uma das cinco plantas, juntamente maceradas em N₂ líquido nos respectivos pontos de coleta. O material foliar macerado foi acondicionado em freezer -80 °C até o momento das análises.

5.2.2 Quantificação do teor de prolina

A determinação do teor de prolina foi feita baseada em metodologia descrita por Bates (1973), com algumas modificações. Aproximadamente 30 mg

de tecido foliar previamente macerados em N₂ líquido foram homogeneizados em 6 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v). Após centrifugação (7500 rpm) por 10 min, 2 mL do extrato foram coletados e adicionados a 2 mL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6M) e 2 mL de ácido acético glacial, em tubos de microcentrífuga de 15 mL. As amostras foram incubadas a 100 °C por 1 h e em seguida colocadas em gelo para finalizar a reação. À solução foram adicionados 4 mL de tolueno, seguindo de agitação por 20 s para a completa extração da prolina.

O sobrenadante foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro a 520 nm e as absorbâncias comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 100 µg. mL⁻¹). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expressos em micromol de prolina por grama de massa fresca (µmol. g MF⁻¹).

5.2.3 Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA)

O malondialdeído, um produto secundário da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, atua como um indicativo de peroxidação lipídica. A metodologia utilizada para a quantificação de MDA baseou-se em protocolo descrito por Heath; Packer (1968). Cerca de 100 mg de tecido foliar macerado foi homogeneizado em 6,5 mL de etanol 80% (v/v) e em seguida a solução foi centrifugada a 5200 rpm por 10 min. Desse extrato foi coletado 1 mL e transferido para outro tubo de microcentrífuga de 15 mL contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,65% (p/v) em ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). As amostras foram incubadas a 95 °C durante 25 min, transferidas para o gelo e centrifugadas novamente para realizar leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 532 nm e 600 nm.

Os equivalentes de MDA foram calculados através da seguinte expressão:

$$\text{Equivalentes MDA} = [(A_{532} - A_{600}) / 155000] \times 10^6$$

Onde A₅₃₂ indica a absorbância máxima do complexo MDA-TBA a 532 nm, A₆₀₀ é a absorbância a 600 nm, que corrige interferentes não-específicos e 155000 é o

coeficiente de extinção molar para o MDA. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores expressos em nanomol de MDA por grama de massa fresca (nmol.g MF^{-1}).

5.2.4 Determinação de antioxidantes totais

O método para determinação de antioxidantes totais foi realizado seguindo Re *et al.* (1999), e fundamenta-se na captura do radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS^+), gerado através da reação entre ABTS e persulfato de potássio. O cromóforo azul escuro apresentado pelo radical é consumido na medida em que os antioxidantes presentes nas amostras reduzem o ABTS^+ a ABTS.

Para a obtenção dos extratos, 100 mg de tecido foliar macerado foram homogeneizados em 2 mL de metanol 50% (v/v), em tubos de microcentrífuga de 15 mL. A solução foi mantida em temperatura ambiente por 1 h e centrifugada a 9500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e reservado, e ao precipitado foram adicionados 2 mL de acetona 70% (v/v), incubando por mais 1 h em temperatura ambiente, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi misturado à primeira solução e o volume completado para 5 mL de água destilada.

O radical ABTS^+ foi preparado adicionando 88 μL de persulfato de potássio 140 mM em 5 mL de ABTS 7 mM. A solução foi mantida no escuro por 12-16 h para a completa oxidação de ABTS em ABTS^+ , sendo posteriormente diluída em etanol 100%, até atingir absorvância de 0,700 ($\pm 0,020$) em 734 nm. O ensaio foi realizado com a adição de 10 μL do extrato em 1 mL da solução de radical ABTS^+ diluída e após 30 min a 30 °C a absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 734 nm. Os resultados foram comparados com curva-padrão de solução de Trolox em etanol (0 - 2 mM). As análises foram feitas em triplicata e os valores expressos em milimol equivalentes de Trolox por grama de massa fresca ($\text{mM equivalentes trolox.gMF}^{-1}$).

5.2.5 Atividade de enzimas antioxidantes

5.2.5.1 Extração de proteínas

Aproximadamente 70 mg de tecido foliar macerado foram homogeneizados em 2 mL tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,3), PVP 1% (p/v) e EDTA 0,1 mM, previamente resfriado a 4 °C. Após centrifugação por 10 min a 4 °C em 7500 rpm, o sobrenadante foi transferido a um novo tubo e mantido no gelo até o momento das análises. Os extratos foram submetidos à quantificação de proteínas totais, realizada pelo método Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA 0 – 15 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) como padrão.

5.2.5.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade de superóxido dismutase é medida através da habilidade da enzima em inibir a redução fotoquímica do NBT (Nitroblue tetrazolium), que leva à formação de um precipitado de cor azul denominado formazana. Íons superóxido são responsáveis pela redução do NBT, sendo formados pela riboflavina fotoquimicamente reduzida pela metionina a uma semiquinona, a qual doa um elétron para o oxigênio, reduzindo-o a superóxido (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

Em tubos de ensaio cobertos com papel alumínio foram adicionados sequencialmente 1660 μL de tampão de ensaio, que consiste em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM e metionina 13 mM, 200 μL de NBT 750 μM , 100 μL do extrato enzimático ou tampão de extração (para os brancos) e 40 μL riboflavina 1 mM. Os tubos foram descobertos (exceto o branco do escuro) e transferidos a um aparato montado 30 cm abaixo de duas lâmpadas fluorescentes de 20 W. Após 6 min de iluminação, a reação foi finalizada ao apagar as lâmpadas e as amostras lidas em espectrofotômetro a 560 nm.

O branco do claro, que consiste em tampão de ensaio sem o extrato enzimático submetido à iluminação, indica 100% da formação da formazana, ou seja, a completa fotorredução do NBT pelo superóxido. Os valores foram

expressos em unidade de atividade por minuto por miligrama de proteína ($\text{UA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$), sendo que uma unidade de atividade corresponde a 50% da inibição da redução do NBT. As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.5.3 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada através do consumo de H_2O_2 monitorado por espectrofotometria a 240 nm, considerando o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 de $43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (PATTERSON *et al.*, 1984). A solução de reação consistiu em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,3) e H_2O_2 10,5 mM. O ensaio teve início com a adição de 50 μL do extrato enzimático diluído contendo 20 μg de proteína à solução de reação, em cuveta de quartzo de 1,5 mL. Foi realizada leitura em 240 nm imediatamente após a adição do extrato e novamente após 2 min de reação.

A diferença na absorbância (ΔA_{240}) foi multiplicada pelo coeficiente de extinção molar do H_2O_2 e a atividade da enzima expressa em milimol de H_2O_2 consumido por minuto por miligrama de proteína ($\text{mmol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$). As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.5.4 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A enzima ascorbato peroxidase catalisa a redução de H_2O_2 a H_2O através da oxidação do ascorbato. A atividade de APX foi determinada seguindo metodologia descrita por Nakano; Asada (1981), com algumas modificações. A solução de reação consistiu em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,3), H_2O_2 2 mM, ascorbato 0,5 mM e 100 μL do extrato enzimático. Foi realizada leitura em espectrofotômetro a 290 nm, um minuto após a adição do H_2O_2 no tampão contendo ascorbato e o extrato enzimático.

Também foram realizadas leituras da solução de reação sem o extrato enzimático (branco do reagente) e do tampão fosfato sem ascorbato, contendo apenas H_2O_2 2 mM e 100 μL do extrato de cada amostra (branco da amostra),

ambas em 290 nm, para correção dos cálculos. A análise foi realizada em triplicata e os valores expressos em unidades de atividade por minuto por miligrama de proteína ($\text{UA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$), sendo uma unidade de atividade representada pela quantidade de enzima que catalisa a oxidação de um micromol de ascorbato.

5.2.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, em parcelas subdivididas no tempo. As duas parcelas foram representadas pelas plantas controle e transgênicas e as quatro sub-parcelas referiram-se às condições de suprimento hídrico (sem estresse, estresse moderado, estresse severo e recuperação). Após análise de variância, as médias foram comparadas por teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS versão 6.4 (SAS, 1995).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Teor de prolina

O teor de prolina livre em folhas manteve-se constante em todas as condições de suprimento hídrico em plantas transgênicas, apresentando valores 2,5 vezes maiores do que plantas controle nas condições sem estresse e estresse moderado. Somente durante o estresse hídrico severo houve acúmulo significativo de prolina em plantas controle, que atingiram os níveis obtidos em plantas transgênicas com o gene *P5CSF129A*. Ainda em relação às plantas controle, foi observada a redução no conteúdo do aminoácido durante a recuperação em comparação ao tratamento estresse hídrico severo, mas com concentração ainda quase duas vezes superior ao obtido em condição normal de irrigação e sob estresse moderado (Figura 9).

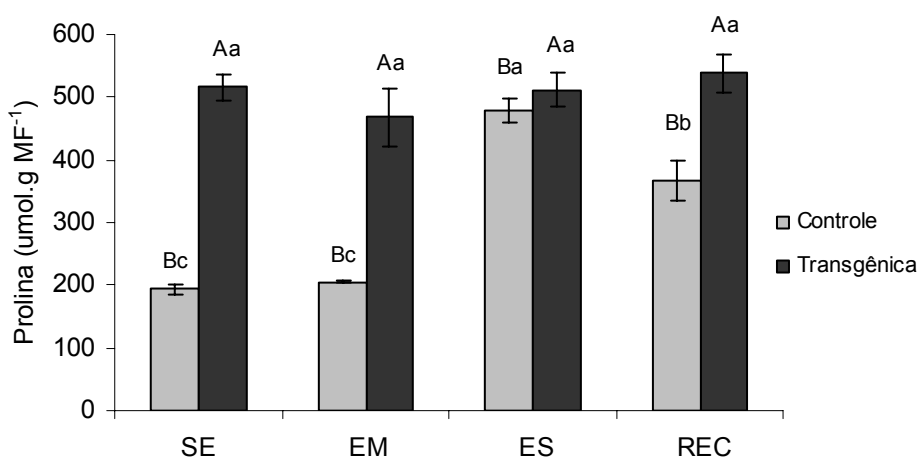


FIGURA 08 - Teor de prolina livre em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.3.2 Conteúdo de malondialdeído (MDA)

Os mesmos níveis de MDA foram obtidos em folhas de ambas as plantas na condição irrigada. Com a imposição do estresse houve aumento significativo de MDA em plantas controle, que atingiram uma quantidade cerca de duas vezes maior no estresse hídrico severo, em comparação à condição normal de suprimento de água (Figura 10). Durante a recuperação, essas plantas apresentaram queda nos níveis de MDA, com valores similares à condição de estresse moderado.

A elevação da peroxidação lipídica foi observada em plantas transgênicas somente a partir do estresse hídrico severo, porém com níveis de MDA atingindo cerca de 1,5 vezes mais do que na condição irrigada. Durante o estresse severo, houve diferença significativa entre essas plantas e as controle não transformadas, que apresentaram acúmulo 1,3 vezes maior quando comparadas às transgênicas com alto acúmulo de prolina. Houve ligeira queda na quantidade de MDA em plantas transgênicas no período de recuperação, sendo que estas apresentaram valores similares aos das plantas controle não transformadas (Figura 10).

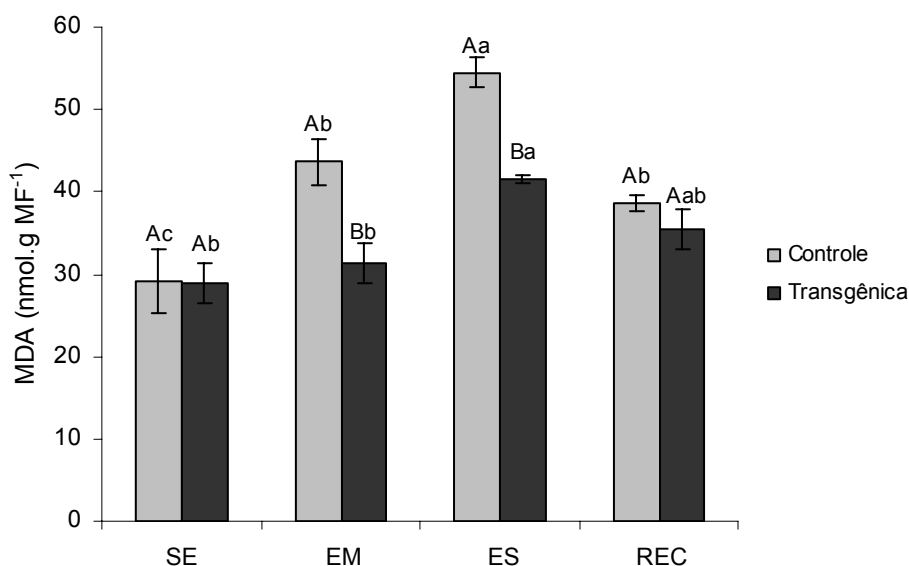


FIGURA 09 - Conteúdo de MDA em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as

condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.3.3 Conteúdo de antioxidantes totais

Somente durante o estresse moderado, as plantas transgênicas com alta produção de prolina apresentaram uma pequena, mas significativa, diferença na quantidade de antioxidantes totais em relação às plantas controle. O estresse hídrico severo resultou em um aumento significativo do acúmulo de antioxidantes totais em ambas as plantas, que atingiram os mesmos níveis nessa condição. Durante a recuperação, houve decréscimo tanto em controle quanto em transgênicas, e ambas apresentaram valores similares de antioxidantes totais (Figura 11).

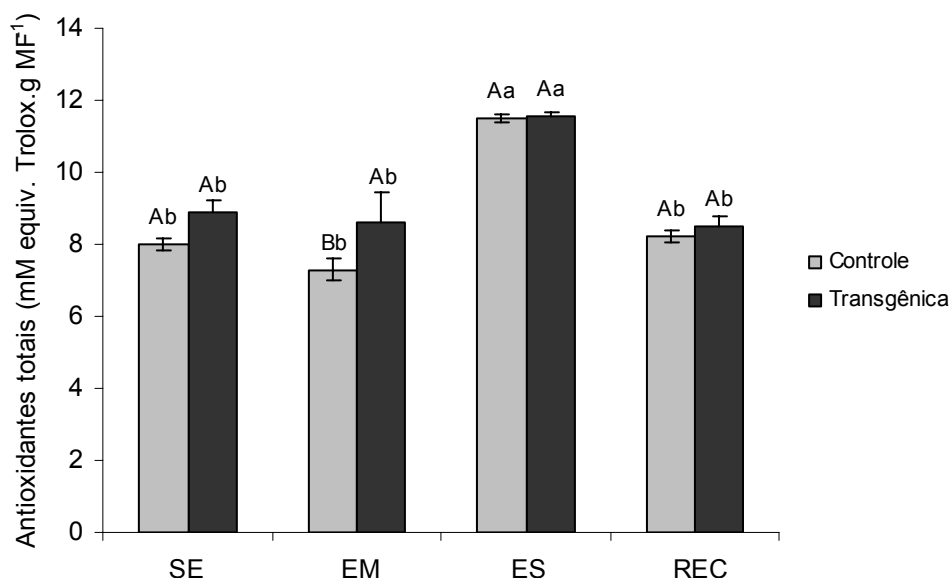


FIGURA 10 - Conteúdo de antioxidantes totais em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.3.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD antes do início do estresse hídrico foi similar em plantas controle e transgênicas. Durante o estresse moderado, houve queda significativa da atividade em plantas controle, o que ocorreu em plantas transgênicas com o gene *P5CSF129A* somente no estresse severo. Nesse tratamento, foram obtidos os mesmos níveis de atividade da SOD em plantas controle e transgênicas. Plantas transgênicas apresentaram maior atividade da SOD durante a recuperação, tanto em relação aos outros níveis de estresse hídrico como também em relação aos níveis de atividade observados nas plantas controle (Figura 12).

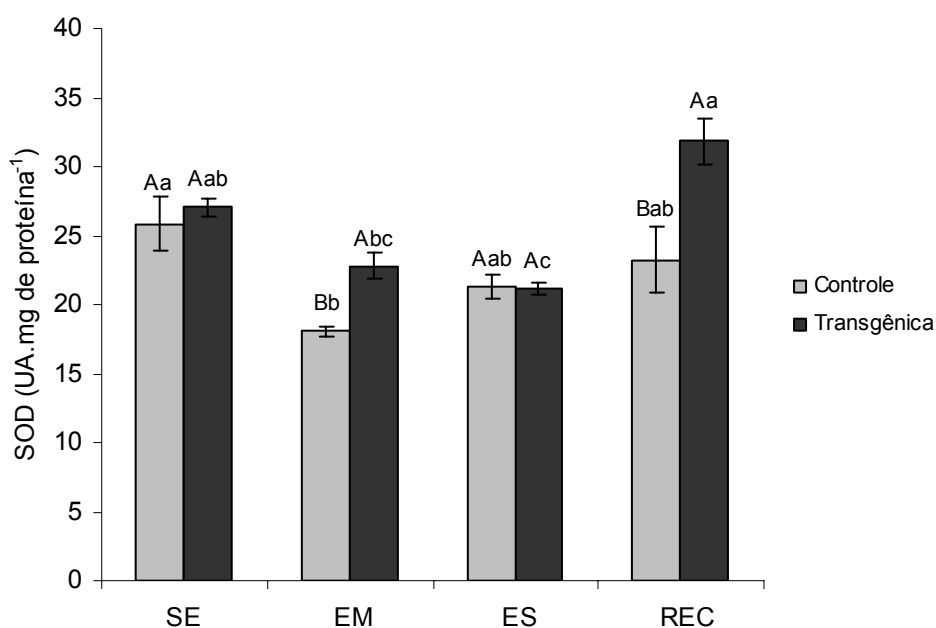


FIGURA 11 - Atividade enzimática de SOD em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.3.5 Atividade da catalase (CAT)

Plantas controle não transformadas apresentaram atividades significativamente maiores da enzima CAT do que as observadas em plantas transgênicas mesmo sob condições normais de suprimento de água. Esta diferença foi observada durante os estresses moderado e severo, sendo que nestes últimos tratamentos houve ainda um aumento significativo na atividade enzimática em plantas controle em relação à condição inicial não estressada. Por outro lado, em plantas transgênicas não houve alteração da atividade da CAT com a submissão ao estresse hídrico, a não ser durante a recuperação. Nesta condição, a atividade da CAT sofreu queda não somente em plantas transgênicas como também nas plantas controle (Figura 13).

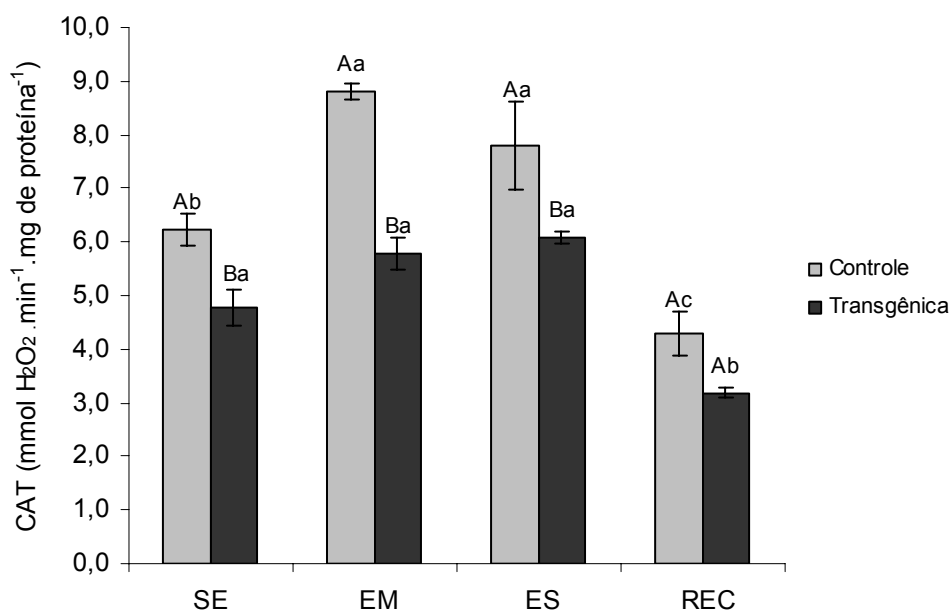


FIGURA 12 - Atividade enzimática da CAT em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = 1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.3.6 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX no início do experimento foi similar em plantas controle e transgênicas com alto acúmulo de prolina. Em plantas controle houve queda na atividade de APX com a imposição do estresse moderado, ponto em que valores obtidos foram significativamente menores do que os observados nas plantas transgênicas. Durante o estresse severo, porém, plantas controle mostraram um aumento na atividade desta enzima. Na recuperação das plantas após o estresse severo, as plantas não transformadas retornaram ao nível de atividade de APX apresentado na condição normal de suprimento de água estabelecida no início do experimento. Nesse ponto, a atividade da APX em plantas transgênicas com o gene *P5CS* apresentou aumento significativo em relação às duas condições de estresse hídrico (moderado e severo), sendo também maior do que em plantas controle (Figura 14).

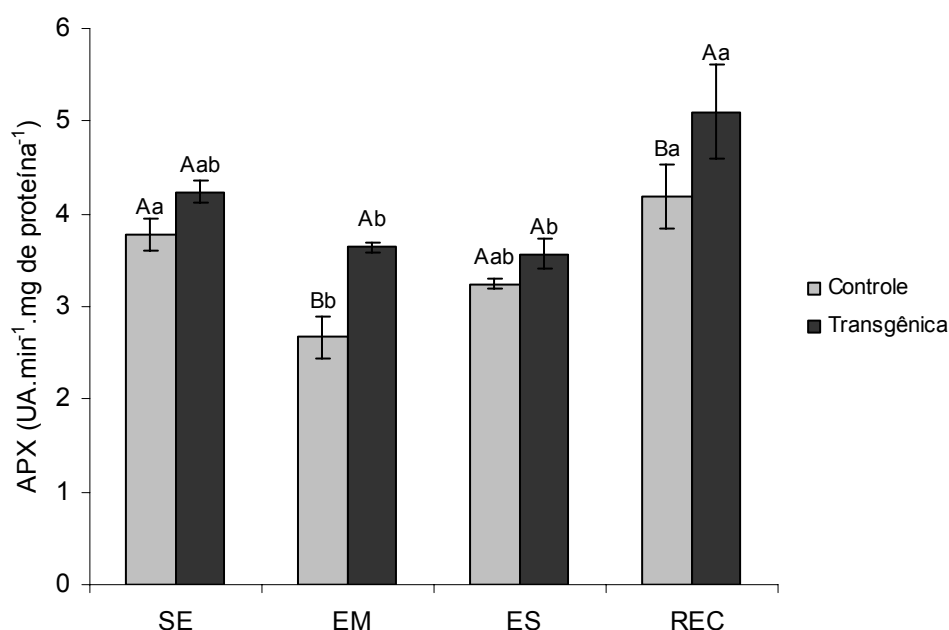


FIGURA 13 - Atividade enzimática de APX em folhas de plantas controle não transformadas e de plantas transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* em quatro condições de suprimento hídrico: SE (Sem estresse; $\Psi_t = -1,3$ MPa), EM (Estresse moderado; $\Psi_t = -2,3$ a $-2,5$ MPa), ES (Estresse severo; $\Psi_t = -3,8$ a $-3,9$ MPa), REC (Recuperação 24 h após irrigação; $\Psi_t = -1,3$ a $-1,9$ MPa). Valores são apresentados por médias \pm erro padrão ($n=3$). Letras maiúsculas comparam plantas controle e transgênicas e letras minúsculas comparam as condições de suprimento hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.4 DISCUSSÃO

A relação entre a presença de prolina em tecidos vegetais e a proteção contra o estresse oxidativo vem sendo demonstrada por diversos autores (HONG *et al.*, 2000; KOCSY *et al.*, 2005; MOLINARI *et al.*, 2007), entretanto, as espécies vegetais utilizadas são conhecidas por naturalmente acumularem baixos níveis de prolina em comparação às plantas de citros (KOCSY *et al.*, 2005; MOLINARI *et al.*, 2007). Também, os estudos sobre os efeitos da prolina são baseados essencialmente em experimentos que utilizam altas aplicações exógenas desse aminoácido (HOQUE *et al.*, 2007a; HOQUE *et al.*, 2007b; OZDEN *et al.*, 2009).

Este trabalho utilizou o porta-enxerto citrumelo 'Swingle', reconhecido por sua alta capacidade de produção e acúmulo de prolina nas folhas mesmo em condições não estressantes (NOLTE; HANSON, 1997). Além disto, a obtenção de plantas transformadas deste híbrido contendo o gene mutante *P5CSF1291* de *V. aconitifolia* (ZHANG *et al.*, 1995) possibilitou a obtenção de um evento de transformação capaz de acumular até 500 μM . gMF^{-1} de prolina livre nas folhas. Assim, neste estudo foi avaliado o papel da prolina na proteção contra ROS e na atividade de enzimas antioxidantes em um modelo vegetal com alta concentração de prolina endógena submetidas a duas condições de déficit hídrico e após a recuperação.

O elevado teor de prolina acumulado em plantas transgênicas de citrumelo 'Swingle' (2,5 vezes maior do que plantas não transformadas) apresentou papel determinante na proteção contra o estresse oxidativo induzido por déficit hídrico. Isto foi demonstrado pelo maior conteúdo de malondialdeído (MDA) obtido em folhas de plantas controle não transformadas do que em plantas transgênicas durante a imposição do estresse (Figura 09). O MDA é um produto secundário da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, processo mediado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (ILANGO VAN *et al.*, 2006). A peroxidação lipídica induz o aumento da permeabilidade de membranas, levando à perda de eletrólitos e funções celulares. Aumentos nos níveis de MDA estão de acordo com resultados obtidos em outros trabalhos (MORAN *et al.*, 1994; PINHEIRO *et al.*, 2004; MOLINARI *et al.*, 2007), e sustentam a hipótese de que a peroxidação

lipídica é induzida por déficit hídrico em sistemas vegetais que não apresentam algum mecanismo de tolerância.

A alteração nos níveis de MDA em plantas controle ocorreu logo durante o estresse moderado, atingindo valores máximos no estresse severo. As plantas transgênicas, entretanto, tiveram os níveis de MDA elevados somente no estresse severo, ainda com valores significativamente menores do que em plantas controle. O alto teor de prolina em plantas transgênicas provavelmente atuou na proteção contra a peroxidação lipídica, por ativar ou mesmo atuar diretamente na remoção das ROS.

Ainda, cabe ressaltar a importância da expressão constitutiva do transgene *P5CSF129A* pelo promotor CaMV 35S, uma vez que plantas transgênicas mantiveram constantemente elevados os níveis de prolina, mesmo na condição irrigada. O teor de prolina em plantas controle no estresse severo foi similar ao de plantas transgênicas, e nem por isso houve redução nos níveis de MDA nessa situação. Possivelmente, a prolina atuou na remoção dos radicais livres desde os estágios iniciais do déficit hídrico, impedindo a ocorrência de danos celulares com o prolongamento do estresse.

O aumento do teor da prolina observado em plantas controle durante o estresse severo (Figura 08) ocorreu como uma resposta natural à imposição ao estresse, já que a síntese da prolina é ativada em condições ambientais adversas como a seca, salinidade, temperaturas extremas e radiação UV, entre outras (DELAUNEY; VERMA, 1993). Além disto, a expressão de transcritos da enzima prolina desidrogenase (PRODH), principal responsável pelo catabolismo deste aminoácido, sofre repressão acentuada em condições de estresse, possibilitando o acúmulo de prolina (VERBRUGGEN *et al.*, 1996).

O gene *P5CSF129A* foi utilizado para transformar geneticamente plantas de tabaco (HONG *et al.*, 2000), que acumularam duas vezes mais prolina do que plantas não transformadas. Quando cultivadas em presença de 200 mM NaCl, plantas controle apresentaram maior acúmulo de MDA do que plantas transgênicas. Esses autores também observaram que a aplicação exógena de 120 mM de prolina em células de tabaco não transgênicas aliviou os sintomas do estresse oxidativo na mesma proporção do que em plantas sintetizando altos níveis de prolina endogenamente. Entretanto, estes dados estão em desacordo

com o observado por Hare *et al.* (2002) em *arabidopsis*, que mostraram um efeito tóxico da aplicação exógena de prolina avaliado pela degradação de cloroplastos e mitocôndrias.

Ozden *et al.* (2009) também constataram uma relação inversa entre níveis de prolina e MDA em folhas de videira submetidas ao estresse por H_2O_2 . Ainda, o acúmulo estresse-induzido de prolina em plantas transgênicas de cana-de-açúcar resultou em menores níveis de MDA do que em plantas não transformadas, mais uma vez constatando o importante papel da prolina na ação contra a peroxidação lipídica (MOLINARI *et al.*, 2007).

Os antioxidantes não-enzimáticos são acumulados em resposta ao estresse oxidativo, e envolvem compostos com capacidade antioxidante intrínseca como o ascorbato, o α -tocoferol, carotenóides, a glutatona e polióis ou alcoóis de açúcar (PERL-TREVES; PERL, 2002). Houve elevação dos níveis destes compostos durante o estresse hídrico severo em plantas de citrumelo 'Swingle', seguida por redução durante a recuperação. Entretanto, não houve diferença no conteúdo de antioxidantes totais entre plantas controle não-transformadas e transgênicas com alto acúmulo de prolina (Figura 10). Esse resultado indica que a presença do aminoácido não interfere em sistemas antioxidantes não-enzimáticos.

Diversos estudos demonstram ocorrer alterações na atividade das enzimas antioxidantes de plantas em resposta à seca, frio, salinidade e metais pesados, sugerindo que possa haver íntima relação do aumento dessas atividades à tolerância aos estresses (LASCANO *et al.*, 2001; KHANNA-CHOPRA; SELOTE, 2006). Ainda neste contexto, outros trabalhos relacionam essa tolerância à influência que a prolina exerce na atividade das enzimas antioxidantes (KOCSY *et al.*, 2005; HOQUE *et al.*, 2007a; HOQUE *et al.*, 2007b; OZDEN *et al.*, 2009).

A superóxido dismutase (SOD) atua como uma primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo por converter o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (FRIDOVICH, 1995). Alguns trabalhos observaram aumento na atividade da SOD em resposta a estresses abióticos como déficit hídrico (JUNG, 2004) e alagamento (ARBONA *et al.*, 2007) e outros constata o inverso. A atividade da SOD em células de tabaco, por exemplo, teve redução de aproximadamente 50% quando submetidas

ao estresse salino, com ou sem aplicação exógena de prolina (HOQUE *et al.*, 2007b).

A presença de prolina *per se* não alterou a atividade da SOD em plantas de citrumelo 'Swingle', já que em condições normais de suprimento hídrico a atividade da enzima foi similar entre plantas controle e transgênicas (Figura 11). Porém, a prolina parece influenciar a atividade enzimática com a imposição do estresse. Isso porque, em plantas controle, mesmo não havendo variação do teor de prolina obtido na condição inicial, durante o estresse moderado houve queda significativa na atividade da SOD e ligeiro aumento no estresse severo, ponto em que se igualou à atividade observada em plantas transgênicas. É válido lembrar que nesta situação o teor de prolina foi similar em ambas as plantas. Durante a recuperação, a atividade aumentou significativamente em plantas transgênicas, tanto em relação às controle quanto aos outros níveis de estresse. Kang e Saltveit (2001) observaram um comportamento semelhante desta enzima em plântulas de pepino previamente tratadas com choque térmico, o que lhes conferiu tolerância ao frio. Quando submetidas a baixas temperaturas, estas tiveram pequena alteração na atividade da SOD, com aumento significativo somente após a recuperação.

Diferentemente da SOD, a atividade da catalase (CAT) nas folhas parece ser diminuída por altos níveis de prolina livre mesmo em condições irrigadas. Plantas transgênicas tiveram menor atividade da enzima do que plantas controle não transformadas em todos os pontos de coleta. A atividade da CAT em plantas controle se apresentou elevada durante o déficit hídrico, havendo significativa redução 24 h após a irrigação. Plantas transgênicas com alto acúmulo de prolina não apresentaram alterações na atividade da CAT, a não ser durante a recuperação, quando houve significativa queda na atividade da enzima (Figura 12).

Esses resultados contrastam com os obtidos por Hoque *et al.* (2007a), que observaram queda na atividade da CAT em células de tabaco submetidas a estresse salino e aumento significativo na atividade enzimática nessas células quando em presença de 20 mM de prolina exógena. Além de tratar-se de espécie diferente da utilizada neste trabalho, convém ressaltar que a alta concentração de prolina exógena utilizada por esses autores não é encontrada em células

vegetais. Altas doses de prolina exógena devem induzir a sua degradação em mitocôndrias, ativando a cadeia de transporte de elétrons. Isso faz com que haja um excesso de liberação de poder redutor que leva à geração de ROS, havendo consequente necessidade de ativação de enzimas antioxidantes, como a CAT (HARE *et al.*, 2002).

A ascorbato peroxidase (APX), assim como a CAT, opera na remoção do H_2O_2 (PERL-TREVES; PERL, 2002). A atividade da APX apresentou comportamento bastante semelhante ao da SOD em plantas de citrumelo 'Swingle'. Na condição irrigada não houve diferença entre a atividade da enzima em plantas controle e transgênicas. Com a imposição ao déficit hídrico moderado, plantas controle tiveram decréscimo significativo na atividade da APX, seguido por um leve aumento no estresse severo, quando níveis de prolina também se elevaram nestas plantas. Plantas transgênicas, por outro lado, tiveram ligeira queda na atividade da APX durante o estresse, havendo significativo aumento durante a recuperação (Figura 13).

Resultados similares foram observados em plantas transgênicas de soja expressando o gene *P5CR* nas orientações senso e antisense submetidas ao déficit hídrico. Tanto os transformantes senso com maior teor de prolina, quanto plantas não transformadas apresentaram queda na atividade da APX durante o estresse, com seguido aumento na recuperação. Porém, nesse caso, atividade da enzima foi ligeiramente maior em plantas controle do que em plantas transgênicas (KOCSY *et al.*, 2005), sugerindo que a proteção contra o estresse oxidativo ocorreu devido ao papel da prolina como removedor de ROS, não havendo, nesse caso, participação de enzimas antioxidantes.

O aumento na atividade da APX muitas vezes é proporcional ao de outras enzimas como a SOD, a CAT e a glutathione redutase (GR) em resposta a diversos fatores ambientais, sugerindo uma co-regulação entre os componentes dos sistemas de remoção de ROS (SHIGEOKA *et al.*, 2002). Neste trabalho, uma relação entre as atividades de APX e SOD foi de fato observada, porém a atividade da CAT apresentou comportamento inverso ao das demais enzimas. O íon superóxido produzido durante o estresse é convertido a H_2O_2 espontaneamente ou pela atividade da SOD. Com a imposição do estresse, a queda na atividade da SOD pode ter ocorrido devido ao acúmulo de H_2O_2 (PERL-

TREVES; PERL, 2002), que por sua vez induz à elevação da atividade da CAT, como foi observado nos estresses moderado e severo de plantas controle. A manutenção da atividade dessa enzima em plantas transgênicas durante a deficiência hídrica comprova que níveis elevados de prolina não induzem o aumento da atividade da CAT, como demonstrado por Hoque *et al.* (2007a), e essa estabilidade provavelmente ocorreu devido à remoção direta de ROS pelo alto teor de prolina presente nessas plantas.

O período de recuperação ao estresse parece ser um estágio delicado que pode ser acompanhado pelo estresse oxidativo, sendo requerida a indução dos sistemas de defesa (MITTLER; ZILINSKAS, 1994). Alguns trabalhos utilizam essa abordagem por observarem a ativação de enzimas antioxidantes somente após a recuperação ao estresse por frio, por exemplo (KANG; SALTVEIT, 2001). Plantas de citrumelo 'Swingle' apresentaram expressivo aumento na atividade de SOD e APX 24 h após a irrigação, havendo, porém, significativa redução na atividade da CAT. Isso provavelmente ocorreu devido a um mecanismo compensatório entre a APX e a CAT, uma vez que ambas as enzimas apresentam função removedora do H_2O_2 resultante da atividade da SOD.

Essa ativação das enzimas durante a recuperação foi mais evidente em plantas transgênicas superexpressando o gene *P5CSF129A*. Sabe-se que os mecanismos de degradação da prolina são ativados após a recuperação ao estresse, e que este processo leva à geração de poder redutor (HARE, 1998). O catabolismo dos altos níveis de prolina em plantas transgênicas, portanto, pode ter gerado $NADPH_2$, que está intimamente ligado ao processo de regeneração do ascorbato, substrato da APX (SHIGEOKA *et al.*, 2002). Ainda, devido à sua propriedade estabilizadora de proteínas (VAN RENSBURG *et al.*, 1993), a prolina presente em plantas transgênicas pode ter contribuído para a atividade de enzimas, como a APX e SOD.

5.5 CONCLUSÕES

- Os altos níveis de prolina em plantas transgênicas contribuem para a proteção contra a peroxidação lipídica resultante do estresse oxidativo induzido por déficit hídrico;
- A prolina não interfere no acúmulo de antioxidantes não-enzimáticos;
- As atividades das enzimas APX e SOD são influenciadas pela prolina durante a imposição do déficit hídrico;
- A atividade da CAT é reprimida pela prolina em condições normais de suprimento hídrico e durante o déficit hídrico;
- A prolina parece desempenhar um importante papel no processo de recuperação ao déficit hídrico, por induzir um aumento na atividade da APX e SOD.

5.6 REFERÊNCIAS

ARBONA, V.; FLORS, V.; JACAS, J.; AGUSTÍN, P. G.; CADENAS, A. G. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p. 388-394, 2003.

BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276–287, 1971.

BERGUER, R. D. A causa e o controle do declínio dos citros. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 1, p. 79-90, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHEN, C; DICKMAN, M. B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. **PNAS**, v. 102, n. 9, p. 3459–3464, 2005.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRÜGER, G. H.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1211-1224, 2004.

DOORENBOS, J.; KASSAM, A. H. **Efeito da água no rendimento das culturas**. Tradução: GHEYI, H. R. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 1994. 306 p. (Estudos da FAO, Irrigação e Drenagem, 33).

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em 25/04/06.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and SODs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97–112, 1995.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. Araraquara, 2003. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/>>. Acesso em: 17/04/03.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4 ed., Oxford: Clarendon Press, 2006.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Arabidopsis* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 68, p. 393–396, 2002.

HARE, P. D. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant and Cell Environment**, v. 21, p. 535-553, 1998.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 2, p. 189-198, 1968.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDANI, A.; JAOUA, L.; SAVOURÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 196, p. 746-752, 2005.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, n. 122, p. 1129-1136, 2000.

HOQUE, M. A.; OKUMA, E.; BANU, M. N. A.; NAKAMURA, K.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 5, p. 553-561, 2007a.

HOQUE, M. A.; BANU, M. N. A.; OKUMA, E.; AMAKO, K.; NAKAMURA, K.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate–glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 11, p. 1457-1468, 2007b.

HOQUE, M. A.; BANU, M. N. A.; NAKAMURA, K.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 813-824, 2008.

ILANGO VAN, G.; VENKATAKRISHNAN, C. D.; BRATASZ, A.; OSINBOWALE, S.; CARDOUNEL, A. J.; ZWEIER, J. L.; KUPPUSAMY, P. Heat shock-induced attenuation of hydroxyl radical generation and mitochondrial aconitase activity in cardiac H9c2 cells. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 290, C313–24, 2006.

JACQUET, H.; RAUX, G.; THIBAUT, F.; HECKETSWEILER, B.; HOUY, E.; DEMILLY, C.; HAOUZIR, S.; ALLIO, G.; FOULDRIN, G.; DROUIN, V.; BOU, J.; PETIT, M.; CAMPION, D.; FRÉBOURG, T. *PRODH* mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. **Human Molecular Genetics**, v. 11, p. 2243–2249, 2002.

KANG, H. M.; SALTVEIT, M. E. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 571-576, 2002.

KAVI KISHOR, P. B.; HONG, Z.; MIAO, G. H.; HU, C. A. A.; VERMA, D. P. S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387-1394, 1995.

KHANNA-CHOPRA, R.; SELOTE, D. S. Acclimatation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than –susceptible wheat cultivar under field conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 276-283, 2007.

KOCSY, G.; LAURIE, R.; SZALAI, G.; SZILAGYI, V.; SIMON-SARKADI, L.; GALIBA, G.; DE RONDE, J. A. Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stress. **Physiologia Plantarum**, v. 124, p. 227–235, 2005.

LASCANO, H. R.; ANTONICELLI, G. E.; LUNA, C. M.; MELCHIORRE, M. N.; GÓMEZ, L. D.; RACCA, R. W.; TRIPPI, V. S.; CASANO, L. M. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 1095–1102, 2001.

MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; RIBEIRO, R. V.; MEDINA, C. L.; STUCHI, E. S.; PAVANI, L. C. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranja 'Natal'. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 373-379, 2007.

MEDINA, C. L. **Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranja 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002, 147 p.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. **The Plant Journal**, v. 5, n. 3, p. 397-405, 1994.

MOLINARI, H. B. C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, v. 99, p. 379-385, 2004.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, J. F. P. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218 – 229, 2007.

MORAN, J. F.; BECANA, M.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRECHILLA, S.; KLUCAS, R. V.; APARICIO-TEJO, P. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta**, v. 194, p. 346–352, 1994.

NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, n. 18, v. 2, p. 185-193, 1999.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NEVES, M. F.; JANK, M. S. (Org.) Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: A agenda 2015. **PENSA/USP/ICONE**, São Paulo, 2006.

NOLTE, K. D.; HANSON, A. D. Proline accumulation and methylation to proline betaine in *Citrus*: Implications for genetic engineering of stress resistance. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 22, n. 1, p. 8-13, 1997.

ORTOLANI, A.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; ALFONSI, R. R. Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. A. (Eds.) **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 153-195.

OZDEN, M.; DEMIREL, U.; KAHRAMAN, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 163–168, 2009.

PATTERSON, B. D.; Mac RAE, E. A.; FERGUSON, I. B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). **Analytical Biochemistry**, v. 139, p. 487-494, 1984.

PERL-TREVES, R.; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. In: _____. **Oxidative Stress in Plants**, 2002.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; FONTES, E. P. B.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, v. 167, p. 1307–1314, 2004.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.) **Citros**. Campinas: 2005. Cap. 4.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

SAS Institute Inc. The SAS system for windows, release 6.4. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., Cary, 1995.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.) **Citros**. Campinas: 2005. Cap. 11.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305–1319, 2002.

TRIPATHI, B. N.; GAUR, J. P. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. **Planta**, v. 219, n. 3, p. 397-404, 2004

VERBRUGGEN, N.; HUA, X. J.; MAY, M.; VAN MONTAGU, M. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. **PNAS**, v. 93, p. 8787–8791, 1996.

VAN RENSBURG, L.; KRÜGER, G. H. J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 188-194, 1993.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing,

abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523-539, 2006.

ZHANG, C. S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, n. 270, p. 20491-20496, 1995.

ZHANG, J.; NGUYEN, H. T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal of Experimental Botany**, n. 50, p. 291–302, 1999.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M.; VERMA, D. P. S.; FAN, Y. L.; WU, R. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science**, v. 139, p. 41-48, 1998.